

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular



Proteínas Polycomb RING1A/RING1B  
y estrés replicativo

TESIS DOCTORAL

Mónica Bravo Madrigal

Madrid, 2016





Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

# Proteínas Polycomb RING1A/RING1B y estrés replicativo

Memoria presentada por Mónica Bravo Madrigal, licenciada en Bioquímica, para optar al  
grado de Doctor en Biología Molecular por Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: Miguel Ángel Vidal Caballero

Centro de investigaciones Biológicas (CIB)

Tutor de Tesis: Ana Ruiz Gómez (UAM)





La presente Tesis Doctoral con título: **Proteínas Polycomb RING1A/RING1B y estrés replicativo** ha sido realizada por Mónica Bravo Madrigal bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Vidal Caballero, perteneciente el departamento de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

El desarrollo del trabajo ha sido posible gracias a la financiación concedida por el Ministerio Ciencia e Innovación (el actual Ministerio de Economía y Competitividad) a través de una beca de Formación de Personal Investigador (BES-2011-047501) asociada al proyecto BFU2010-18146, el proyecto SAF2013-47997-P, así como a través de la Comunidad Autónoma de Madrid gracias al proyecto S2010/BMD-2470 del programa ONCOCYCLE.

VºBº del director de la tesis:

Dr. Miguel Ángel Vidal

VºBº del tutor:

Dra. Ana Ruiz



## **AGRADECIMIENTOS**



Este trabajo, realizado durante estos cuatro últimos, se lo debo a mucha gente. En primer lugar, a mi director de Tesis, el Dr Miguel Ángel Vidal. Gracias por contar conmigo para trabajar en este laboratorio, por inducir un poco de orden en mi caótica cabeza y enseñarme tanto. Sobre todo, gracias por apoyarme y confiar en mí con este proyecto, con las dificultades y el esfuerzo añadido que conlleva meterse en un campo nuevo en el histórico del laboratorio. A mi “segunda jefa” y “quinta madre”, la Dra. Carmela Calés, con la que empecé mis primeros pinitos en esta profesión. Gracias por darme la oportunidad de empezar a trabajar en esto tan bonito que es la ciencia, y por los ratos y charlas de cosas científicas y cosas no tanto...

A mis compañeros del 106, Fabio y Kasia, por que sin ellos estos años habrían sido muchos más duros. Gracias Fabio, por aguantar piscinonas varias y por tus constantes aportaciones al fenotipo de p21, seguro que algún día (muy lejano) será la clave de todo.

Gracias a la gente que trabaja en cada uno de los servicios del CIB, por ayudarme siempre. En especial gracias a la gente del servicio de Microscopía confocal del CIB, Maite, Gema y Lorena, por tener la paciencia de ayudarme a hacer tan bonitas fotos y enseñarme a utilizar esa gran máquina. Gracias a las niñas del final del pasillo, Ana, Lore, Ester, Patri, Noe..., por adoptarnos en sus cenas y por las cañitas de después de trabajar. A mi vecina Tere, por tener siempre una sonrisa para mí y una palabra de aliento.

A mis Bioquis, porque aunque estos últimos años no hayamos trabajado juntos, seguramente no estaríamos aquí ahora sin esas noches de overnight, ni tantos momentos y tertulias.

A mi familia, por todas las cosas que me he perdido por tener que “cambiar el agua al canario” les dedico unas figuritas de esta tesis. A mis niñas, Yaiza y Carlota, las que más colores tengan.

Gracias a Pancho y Cane, por hacer que los días de escritura en casa sean más llevaderos (aunque a veces menos productivos).

A mis padres, por ser mi soporte y apoyo para todo. Por aguantar lloreras y risas por creer siempre que “sí que puedo”. Soy lo que soy y he llegado hasta aquí gracias a vosotros. Gracias mamá por ser mi referente y conseguir sacar lo mejor de mí. Esta es de las dos!

A ti, mi amor, por conseguir que me despierte cada mañana con un “buenos días cariño, ya es de día”. Por apoyarme y acompañarme siempre en cualquier situación, y sobre todo en esta época de tránsito para mí, que has vivido tan de cerca. Por darme paz y hacerme tan feliz.



## ÍNDICE





<b>ABSTRACT</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1. REGULADORES DE CROMATINA POLYCOMB</b>	<b>13</b>
1.1 Complejos represores Polycomb	14
1.2 Complejos PRC1	15
<b>2. REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR POLYCOMB</b>	<b>16</b>
2.1 Regulación de la transcripción	17
2.2 Compactación de cromatina	17
<b>3. RECLUTAMIENTO DE POLYCOMB A CROMATINA</b>	<b>18</b>
3.1 Proteínas de unión a DNA	18
3.2 RNAs no codificantes	19
3.3 Marcas de histonas	19
3.4 Relación entre PRC1 y PRC2	20
<b>4. RING1A Y RING1B, LAS PROTEÍN LIGASAS QUE DEFINEN PRC1</b>	<b>20</b>
4.1 Ubiquitinación mediada por RING1A y RING1B	21
4.2 Funciones transcripcionales de RING1A y RING1B	23
4.2.1 <i>Desarrollo embrionario y mantenimiento de células madre</i>	24
4.2.2 <i>Relación de RING1A y RING1B con ciclo celular y transformación tumoral</i>	24
4.3 Funciones no transcripcionales de RING1A y RING1B	25
<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>1. CULTIVOS Y TRATAMIENTOS CELULARES</b>	<b>33</b>
1.1 Fibroblastos embrionarios	33
1.2 Líneas celulares establecidas	33

<b>2. ANALISIS DE LA PROLIFERACIÓN, REPLICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR</b>	<b>34</b>
2.1 Curva de acumulación celular	34
2.2 Marcaje de células replicativas	34
2.3 Análisis bidimensional del ciclo celular	35
2.4 Medida de la apoptosis	35
<b>3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CELULAR E INACTIVACIÓN DE Cdkn1a/p21</b>	<b>35</b>
3.1 Plásmidos utilizados	35
3.2 Obtención de partículas virales	36
3.3 Transducción celular	37
<b>4. INMUNOFLUORESCENCIA</b>	<b>37</b>
4.1 Procesamiento de las muestras	37
4.2 Adquisición y análisis de imagen	38
<b>5. ANÁLISIS DE FIBRAS DE DNA</b>	<b>39</b>
<b>6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA Y qPCR</b>	<b>40</b>
<b>7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE mRNA (RT-qPCR)</b>	<b>41</b>
<b>8. WESTERN BLOT</b>	<b>41</b>
<b>9. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA</b>	<b>42</b>
9.1 Ensayo de ligación por proximidad (PLA)	42
9.2 Fraccionamiento subcelular y co-inmunoprecipitación	42
<b>10. EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA: ENSAYO ALCALINO DE COMETAS</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>47</b>
<b>1. RING1A Y RING1B EN PROGRESIÓN DE CICLO CELULAR</b>	<b>49</b>
1.1 Fallo proliferativo en ausencia de proteínas RING1	49
1.2 El defecto de crecimiento en ausencia de proteínas RING1 se debe a un aumento de	

reguladores de ciclo celular	52
<b>2. PROTEÍNAS RING1 Y REPLICACIÓN</b>	<b>54</b>
2.1 Parada de horquillas de replicación y aparición de roturas de DNA en ausencia de RING1A y RING1B	54
2.2 La actividad E3 ligasa de RING1B está relacionada con la aparición de estrés replicativo	57
2.3 Defecto de replicación de cromatina pericentromérica en ausencia de RING1	59
2.4 La ausencia de proteínas RING1 provoca la aparición de roturas en heterocromatina derivadas de estrés replicativo	63
2.5 Progresión a través de la fase S dependiente de la actividad E3 ligasa de RING1B	66
2.6 La monoubiquitinación de H2AK119 dirigida a heterocromatina pericentromérica restaura la replicación en células deficientes en proteínas RING1	69
<b>3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RING1 EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS REPLICATIVO</b>	<b>74</b>
3.1 Fallo de reclutamiento de proteínas de estabilización de horquillas de replicación en ausencia de RING1A y RING1B	74
3.2 RING1B interacciona con la proteína de estabilización FANCD2	81
3.3 Aberraciones mitóticas en ausencia de RING1A y RING1B.	86
<b>4. RING1 Y PUNTO DE CONTROL DE FASE S</b>	<b>88</b>
4.1 Ineficiente señalización ante el estrés replicativo en células deficientes en proteínas RING1	88
4.2 Las proteínas RING1 están implicadas en el reclutamiento del complejo de daño a DNA 9-1-1	90
4.3 RING1B en la proximidad del replisoma	93
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>95</b>
<b>1. PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RING1 EN EL ESTRÉS REPLICATIVO</b>	<b>97</b>
1.1 Señalización del daño a DNA mediada por ATR	97
1.2 Estabilización y reinicio de horquillas de replicación paradas	100
<b>2. PROTEÍNAS RING1 Y REPLICACIÓN</b>	<b>102</b>
2.1 Influencia del estado de la cromatina pre-existente.	102

2.2 Reorganización de cromatina	103
<b>3. INESTABILIDAD GENÓMICA, TRANSFORMACIÓN CELULAR Y RING1B</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>111</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>136</b>

## **ABSTRACT**



Polycomb proteins RING1A and RING1B are the E3 ligases of Polycomb Repressive Complex 1, responsible of H2A monoubiquitilation in lysine 119. This modification participate in transcriptional repression mediated by Polycomb group proteins needed for embryonic development and lineage specification in cellular differentiation.

By using mouse embryonic fibroblast and human cellular model of conditionally inactive E3 ligases (RING1A and RING1B), we characterize a new function of RING1 proteins in DNA replication and in DNA damage response to replicative stress. In unperturbed cells, RING1 proteins deficiency causes slow elongation and fork stalling during DNA replication that is associated with the accumulation of mid and late S-phase cells. Signs of replicative stress and colocalisation of double-strand breaks with pericentromeric heterochromatic (PCH) domains were enriched in cells at mid S-phase, the stage at which PCH is replicated. Altered replication was rescued by targeted monoubiquitylation of PCH through methyl-CpG binding domain protein 1. We describe a defect in replication stress signaling by the checkpoint kinase ATR, and in fork stabilization pathway mediated by FANCD2. This alterations could be related to the novel interactions described in this work between RING1B and replisome components that participates in ATR activation, as well as with FANCD2.

Moreover, the acute senescence associated with the depletion of RING1 proteins, which is mediated by p21 (also known as CDKN1a) upregulation, could be uncoupled from a response to DNA damage.

We identify a dual RING1B function in promote heterochromatin replication dependent of RING1B ubiquitilation capacity and a relevant involvement in replicative stress signaling and response through a H2A ubiquitilation independent mechanism by which RING1B presence, even inactive, participates in ATR activation and replication fork stabilization. All together, in this work we provide mechanisms that allow us to extend RING1 proteins function from transcriptional repression to DNA replication and DNA damage response.





## **ABREVIATURAS**



4'-OHT:	4'-hidroxitamoxifeno
53BP1:	<i>p53 binding protein 1</i>
9-1-1:	Rad9-Rad1-Hus1 <i>checkpoint clamp</i>
ATM:	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR:	<i>ATM- and Rad3-related</i>
BMI1:	<i>B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog</i>
BRCA:	<i>breast cancer</i>
BrdU:	bromo-desoxiuridina
BSA:	albúmina sérica bobina ( <i>bobine serum albumina</i> )
CBX:	<i>chromobox domain</i>
CDK:	quinasa dependiente de ciclina ( <i>cyclin dependent kinase</i> )
cDNA:	ácido desoxirribonucleico complementario ( <i>complementary desoxyr</i> )
ChIP:	immunoprecipitación de cromatina ( <i>chromatin immunoprecipitation</i> )
CKi:	inhibidor de quinasa dependiente de ciclina ( <i>cyclin dependent kinase inhibitor</i> )
CldU:	cloro-deoxiuridina
DAPI:	4',6-diamino-2-fenilindol
DDR:	respuesta de daño a DNA ( <i>DNA damage response</i> )
DEO:	distancia entre orígenes
DMEM:	modificación de Dulbecco del medio de Eagle ( <i>Dulbecco's modified Eagle médium</i> )
DNA:	ácido desoxirribonucleico
DNMT:	<i>DNA methyltransferases</i>
Dox:	doxiciclina
DSB:	roturas de DNA de doble cadena ( <i>double strand breaks</i> )
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
EdU:	etnil-desoxiuridina

EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético

EHZ: enhancer of zeste homolog

ERT: receptor de estrógenos (*estrogen receptor*)

EtOH: etanol

FANCD2: *fanconi anemia complementation group D2*

FBS: suero bovino fetal (*fetal bovine serum*)

FITC: fluoresceína-5-isotiocianato

GFP: proteína verde fluorescente (*Green fluorescence protein*)

H2AK119Ub: histona H2A ubiquitada en la lisina 119

H3K27me3: histona H3 trimetilada en la lisina 27

H3K36me3: histona H3 trimetilada en la lisina 36

H3K9me3: histona H3 trimetilada en la lisina 9

HAT: histona acetil transferasa

HCl: ácido clorídrico (*hydrochloric acid*)

HR: recombinación homóloga (*homologous recombination*)

HRPO: peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*)

HU: hidroxiiurea

ICL: uniones intercatenarias (*interstranded crosslinks*)

IdU: yodo-desoxiuridina

IF: inmunofluorescencia

IP: inmunoprecipitado

Kap 1: KRAB-associated protein-1

Kb: kilobases

KD: inactivación génica mediante shRNA (*Knockdown*)

KDM2B: *Lys specific demethylase 2B*

LiCl: cloruro de litio (*lithium chloride*)

lncRNA: RNA largo no codificante (*long non-coding RNA*)

MBD1: *methyl-CpG-binding domain protein 1*

MCM: *mini-chromosome maintenance*

MEFs: fibroblastos murinos embrionarios (*murine embryonic fibroblasts*)

NaCl: cloruro sódico

NHEJ: unión por extremos no homólogos (*non-homologous end joining*)

Ns: no significativo

PBS: tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PcG: grupo Polycomb (*Polycomb Group*)

PCGF: *Polycomb group RING finger*

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PFA: para-formaldehído

PHC: heterocromatina pericentromérica (*Pericentromeric heterochromatin*)

PI: yoduro de propidio (*propidium iodide*)

PLA: ensayo de ligación por proximidad (*proximity ligation assay*)

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*)

Pol: polimerasa

PRC: complejo represor Polycomb (*Polycomb Repressive Complex*)

PRE: elementos de respuesta Polycomb (*Polycomb-responsive elements*)

RFC: *replication factor C*

RFP: proteína roja fluorescente (*red fluorescence protein*)

RING1A: *Really interesting new gene 1A*

RING1B: *Really interesting new gene 1B*

RIPA: *radio immunoprecipitation assay*

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: ribonucleasa

RNF: *ring finger protein*

RPA: *replication protein A*

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real (*real time quantitative PCR*)

RYBP: *Ring1 and YY1-binding protein*

SAM (dominio): *Sterile alpha motif*

SD: desviación estándar (*standart deviation*)

SDS: dodecil sulfato sódico (*sodium-dodecil-sulfate*)

shRNA: pequeña horquilla de ARN (*short hairpin RNA*)

ssDNA: DNA de cadena sencilla (*single stranded DNA*)

TPBS: *tween phosphate buffered saline*

TTBS: *Tris-Buffered Saline and Tween 20*

UTR: región no traducida (*untranslate region*)

WB: western blot

Wt: fenotipo silvestre (*wild type*)

$\gamma$ H2AX: Histona H2AX fosforilada en fosfato gamma

# INTRODUCCIÓN





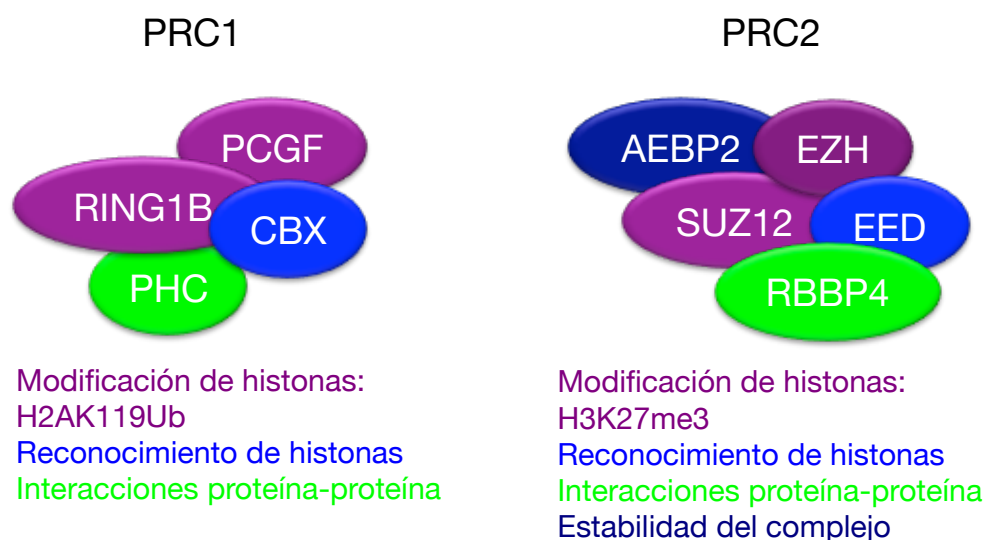
En los organismos eucariotas, el DNA se encuentra asociado con proteínas histónicas y no histónicas formando una estructura altamente compactada en el núcleo celular llamada cromatina. Las histonas y el DNA forman la unidad estructural del genoma, los nucleosomas, esenciales para el almacenamiento y organización del material genético. El estado de compactación de las fibras de cromatina determinan la accesibilidad del DNA y tiene por tanto gran importancia para el establecimiento y mantenimiento de los distintos patrones de expresión que determinan el uso del genoma. Esta organización de la cromatina está regulada por modificaciones postraduccionales de las histonas, que incluyen acetilación, fosforilación, metilación o ubiquitinación. Basados en la distinta combinación de estas modificaciones se generan estados de cromatina transcripcionalmente activa o inactiva, pudiendo sufrir transiciones dinámicas entre ambos durante el proceso de diferenciación celular. Entre las modificaciones postraduccionales de histona se encuentran la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3) o la ubiquitinación de H2A en la lisina 119 (H2AK119Ub). Ambas modificaciones son dependientes del grupo de reguladores epigenéticos Polycomb, grupo al que pertenecen las proteínas de las que trata este trabajo, RING1A y RING1B.

## 1. REGULADORES DE CROMATINA POLYCOMB

Las proteínas del grupo polycomb (PcGs, Polycomb group) son reguladores epigenéticos que participan en la represión génica durante el desarrollo embrionario y diferenciación celular (Mohn et al 2008, Boyer et al 2006, Lee et al 2006, Bracken et al 2006). Los genes PcG fueron inicialmente descritos como determinantes morfogenéticos en *Drosophila melanogaster*, de forma que mediante represión transcripcional de los genes homeóticos (Hox), determinaban el eje anteroposterior del organismo (Duncan 1982, Lewis 1978). Su actividad represora se debe, en parte, a la generación de estructuras de cromatina inactivas en los promotores de sus genes diana gracias a modificaciones de histonas llevadas a cabo por proteínas con actividad enzimática. Además estos complejos presentan funciones represoras adicionales como la compactación de la cromatina (Eskeland et al. 2010; Bantignies and Cavalli 2011).

## 1.1 Complejos represores Polycomb

Estudios bioquímicos revelaron que las proteínas Polycomb actúan formando dos complejos multiproteicos llamados Complejo Represor Polycomb 1 y Complejo Represor Polycomb 2 (Polycomb repressive complex, PRC1 y PRC2). En mamíferos, PRC2 contiene la metiltransferasa enhacer of zeste 2 (EZH2), o su homólogo EZH1, que pueden catalizar la mono-, di- y trimetilación en la lisina K27 de la histona H3 (H3K27me3), (Margueron et al. 2008; Shen et al. 2008). A EZH1/EZH2 se une suppressor of zeste 12 (SUZ12), esencial para la actividad del complejo ya que interacciona con la región diana y los nucleosomas de alrededor regulando la actividad metiltransferasa (Schmitges et al. 2011). Además el complejo PRC2 cuenta con un módulo de unión a histonas formado por las proteínas EED y



**Figura 1:** Complejos represores Polycomb PRC1 y PRC2. Se muestran las proteínas centrales de cada complejo y sus funciones asociadas

RBBP4 y una proteína adicional, AEBP2 que promueve la estabilidad del complejo (Ciferri 2012; Schwartz and Pirrotta 2013). La modificación de la histona H3 mediada por PRC2 puede actuar como sitio de unión de PRC1 a través de la(s) subunidad(es) CBX (chromobox protein) que porta un cromodominio capaz de reconocer la H3K27me3, generando un mecanismo de reclutamiento ordenado de PRC2 y PRC1 a sus genes diana. Las proteínas CBX, junto con uno de los seis miembros de la familia proteica Polycomb group RING finger (PCGF) y una proteína RING1, RING1A o su parálogo RING1B, conforman la parte central de PRC1. Este complejo cataliza la monoubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119

(H2AK119Ub) a través de la actividad E3 ubiquitín ligasa de RING1A y RING1B (Fang et al. 2004; Napoles et al. 2004).

## 1.2 Complejos PRC1

La actividad enzimática de PRC1 reside en una E3 ligasa heterodimérica formada por proteínas que contienen un dominio RING: uno de los parálogos RING1, (RING1A o RING1B) y una proteína de las que forman la familia proteica Polycomb group of Ring-Finger (PCGF) que actúa como cofactor positivo (Napoles et al. 2004). A esta parte central del complejo, definida por la subunidad PCGF que contenga, se unen un número variable de otras proteínas (Gao et al. 2012; Gearhart et al. 2006; Levine et al. 2002; Ogawa et al. 2002; Sánchez et al. 2007).

Así los complejos formados por PCGF2/MEL18 o PCGF4/BMI1 son nombrados como PRC1.2 y PRC1.4, respectivamente. Estos complejos son considerados PRC1 canónicos y característicamente contienen una o más proteínas de la familia CBX, que porta un cromodominio en el extremo amino terminal implicado en el reconocimiento y la unión de H3K27me3 (E. Bernstein et al. 2006; Fischle, Wang, and Allis 2003). Además, tanto PRC1.2 como PRC1.4 contienen los parálogos Polyhomeotic (PHC1, PHC2, PHC3), proteínas con un dominio SAM (steril alpha motif) implicado en las interacciones proteína-proteína (Qiao and Bowie 2005) que participan en la represión mediada por Polycomb (Isono et al. 2013).

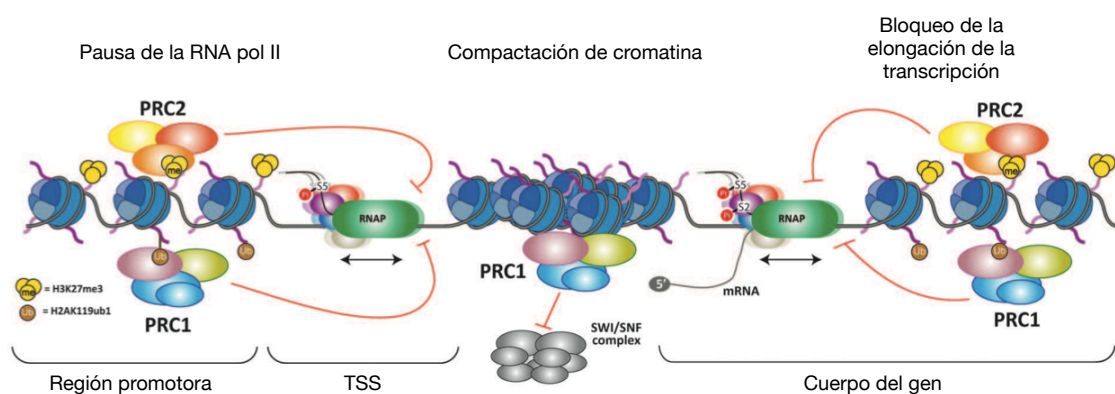
<b>PRC1 canónicos</b>	<b>PRC1 no canónicos</b>		
<b>PRC1.2; PRC1.4</b>	<b>PRC1.1</b>	<b>PRC1.6</b>	<b>PRC1.3; PRC1.5</b>
PCGF2; PCGF4	PCGF1	PCGF6	PCGF3; PCGF5
RING1	RING1	RING1	RING1
PHC (1-3)	RYBP/YAF2	RYBP/YAF2	RYBP/YAF2
CBX (2,4,7,8)	BCOR	HP1 $\gamma$	CSNK2A
SMCH1	USP7	L3MBTL2	FBRS
	KDM2B	E2F6	
		HDAC	
		WDR5	

**Tabla 2.** Diversidad de complejos PRC1 en mamíferos. RING1 se refiere a los parálogos RING1A y RING1B. Extraído de Gao et al. 2012

La región en RING1B de unión a la subunidad CBX (Satijn et al. 1997; Schoorlemmer et al. 1997) coincide con la región a la que se une la proteína RYBP (RING1 and YY1-binding protein) (García et al. 1999) y su parólogo Yaf2 (YY1-associated factor 2) (Kalenik et al. 1997), haciéndose mutuamente excluyentes en complejos PRC1. Esto podría explicar por qué otros complejos PRC1 (PRC1.1, PRC1.3, PRC1.5, y PRC1.6) presentan subunidades RYBP o YAF2 y no CBX (Gao et al. 2012) y son conocidos como complejos no canónicos. En estos complejos se ha visto, por ejemplo, la asociación de RING1B con KDM2B, una proteína de unión a DNA con actividad H3K36 demetilasa (PRC1.1) (Gearhart et al. 2006; Sánchez et al. 2007) o con el factor de transcripción E2F6 (Ogawa et al. 2002). En la tabla 2 se muestra la composición de los distintos complejos PRC1. El hecho de que las subunidades PCGF presenten patrones solapantes de unión a DNA (Gao et al 2012) sugiere distintas funciones de los diferentes complejos PRC1, aunque la relevancia biológica de la diversidad de complejos PRC1 continúa bajo estudio.

## 2. REGULACIÓN GÉNICA MEDIADA POR POLYCOMB

Aunque el mecanismo por el cual las proteínas Polycomb regulan el uso del genoma está sin resolver, existen dos grandes mecanismos propuestos para la represión transcripcional mediada por Polycomb: a través de la regulación de la actividad de la RNA polimerasa II (RNA pol II) y mediante mecanismos de compactación de cromatina.



**Figura 2.** Posibles mecanismos de represión génica mediada por PcG. Han sido propuestos dos mecanismos principales. El primero, relacionado con la interferencia de la actividad de la RNA pol II tanto a nivel de iniciación (promotores bivalentes) como a nivel de elongación de la transcripción a través de las marcas de histonas. Por otro lado, la compactación de cromatina mediada por proteínas Polycomb ha sido relacionada con el bloqueo de la accesibilidad de factores remodeladores de cromatina como SWI/SNF. Adaptado de Aranda, Mas, and Croce 2015.

## 2.1 Regulación de la transcripción

En los promotores, las secuencias CpG a las que se unen los complejos Polycomb están enriquecidas en H3K4me3 y H3K27me3, marcas relacionadas con “activación” y “represión” transcripcional respectivamente. La presencia de estos dos tipos de marcas, impide la iniciación de la transcripción manteniendo a la RNA pol II en un estado de pausa. Son conocidos como promotores bivalentes y muestran una reducida expresión en células pluripotentes. Sin embargo durante la diferenciación celular estos promotores retienen una u otra marca dependiendo del estado de activación del gen en el nuevo estadio de diferenciación (Azuara et al. 2006; B. E. Bernstein et al. 2006; Cui et al. 2009; Mikkelsen et al. 2007). De hecho, la inactivación de proteínas pertenecientes a PRC1 y PRC2 resulta en desrepresión de estos promotores (Boyer et al. 2006) pudiendo afectar a la capacidad de autorrenovación y pluripotencia de las células madre embrionarias (ESC) (Pasini et al. 2007, Shen et al 2008, Endoh et al 2008).

La ubiquitinación de H2A también ha sido relacionada con la actividad de la RNA pol II. La pérdida de ubiquitinación de H2A tras la inactivación de las proteínas RING1, correlaciona con un incremento en la RNA pol II unida a los promotores regulados por PcG (Stock et al. 2007, Endoh et al. 2012). Además, la presencia de H2A ubiquitinada podría estar interfiriendo con la liberación del dímero H2A-H2B y por tanto interfiriendo con la elongación de la transcripción (Zhou 2008).

## 2.2 Compactación de cromatina

Estudios en *Drosophila* y en células de mamífero sugieren que tanto proteínas de componentes de PRC1 como de PRC2 podrían mediar la represión génica a través de mecanismos de compactación de cromatina (King et al. 2005, Margueron et al. 2008). En el caso de PRC1, ha sido mostrada la compactación *in vivo* en la represión de los genes Hox de células embrionarias: mediante técnicas de fluorescencia por hibridación *in situ* (FISH) se observa que tras la eliminación de RING1B, los genes Hox de la periferia del grupo se activan y separan del centro que permanece compacto e inactivo (Eskeland et al. 2010). Además, el mecanismo por el cual RING1B media la compactación de cromatina podría ser independiente de su capacidad de ubiquitinación de la histona H2A (Eskeland et al. 2010, Illinworth 2015).

La compactación de cromatina ha sido propuesta como una forma de bloquear el acceso a factores remodeladores de cromatina como SWI/SNF (Levine et al. 2002, Francis et al. 2001), cuya acción es necesaria para la activación de la transcripción.

### 3. RECLUTAMIENTO DE POLYCOMB A CROMATINA

La asociación de los complejos Polycomb a sus genes diana viene determinada a través de mecanismos que implican proteínas de unión a DNA, RNAs no codificantes e interacciones con histonas presentes en la cromatina.

#### 3.1 Proteínas de unión a DNA

Estudios funcionales en *Drosophila melanogaster* determinaron la existencia de secuencias de cientos de pares de bases de DNA capaces de reclutar complejos PcG llamadas elementos de respuesta Polycomb (PRE, Polycomb response elements) (Chan et al. 1994; Mihaly et al. 1998; Tillib et al. 1999). Estas secuencias se pueden encontrar kilobases corriente arriba o abajo del promotor diana, o en algunos casos cerca del sitio de comienzo de transcripción. El reclutamiento de complejos PcG a estas secuencias vendría mediada por factores transcripcionales de unión a DNA (Müller and Kassis 2006). En mamíferos no se conocen secuencias similares. Sin embargo, trabajos en células pluripotentes de mamíferos han determinado que PRC1 y PRC2 se unen preferentemente a regiones ricas en citosina y guanina sin metilar, (islas CpG) (Ku et al. 2008; Mikkelsen et al. 2007) en las regiones promotoras (Boyer et al. 2006; Lee et al. 2006), por lo que estas secuencias podrían funcionar como el equivalente de los PRE en mamíferos.

En el caso de PRC1, su reclutamiento depende de la presencia de KDM2B, una proteína de unión a DNA que forma parte de uno de los complejos no canónicos con RING1B (PRC1.1). Esta proteína posee un dominio ZF-CxxC que puede unirse a las islas CpG sin metilar (He et al. 2013, Wu, Johansen, and Helin 2013, Farcas et al. 2012). Sin embargo KDM2B aparece unida en la mayoría de las CpG, no solo en las de los promotores diana (Wu, Johansen, and Helin 2013) sugiriendo la existencia de otro mecanismo adicional para el establecimiento de los dominios Polycomb.

La observación de la unión preferencial de los complejos PRC a las islas CpG, ha permitido la elaboración de un modelo de reclutamiento mediante el cual la asociación de Polycomb a las islas CpG de sus promotores diana dependería de un proceso de muestreo o “sampling” (Klose et al. 2013). Según este modelo, tanto la unión de PRC1 y PRC2, como de sus antagonistas, las proteínas del grupo Trithorax (TrxG) (Ringrose and Paro 2004) se unirían estocásticamente a islas CpG. Así, en ausencia de transcripción, las proteínas PcG que ocupan la cromatina se acumulan por bucles de refuerzo positivo, impidiendo las actividades de TrxG. Sin embargo en genes que se están transcribiendo se favorece la acumulación de TrxG antagonizando la función de los PRCs (Klose et al. 2013).

### 3.2 RNAs no codificantes

Otro mecanismo de reclutamiento vendría dado por la interacción con RNAs largos no codificantes (lncRNA, long non-coding RNA). Tal es el caso por ejemplo del lncRNA *Xist* (X inactive specific transcript), de cuya presencia depende el reclutamiento del PRC2 para inactivar un cromosoma X en mamífero durante el proceso de compensación de dosis (Kohlmaier et al. 2004, Leeb and Wutz 2007). Otro ejemplo es el del lncRNA *HOTAIR* (HOX transcript antisense RNA) expresado en el locus *HOXC* del cromosoma 12 humano, que parece funcionar en *trans* dirigiendo a PRC2 al locus *HOXD* en el cromosoma 2 (Rinn et al. 2007).

### 3.3 Marcas de histonas

Algunas subunidades Polycomb poseen la capacidad de reconocer y unirse a marcas específicas en las histonas proporcionando un mecanismo de asociación o de repulsión del contacto con el nucleosoma. Tal es el caso de las subunidades de PRC1 que poseen un dominio cromobox, que son capaces de unir tanto *in vivo* como *in vitro* la marca H3K27me3 (E. Bernstein et al. 2006; Fischle, Wang, and Allis 2003). En el caso de PRC2, la subunidad EED tiene la capacidad de unir la marca de histona que cataliza, H3K27me3, a través de su dominio WD40, estimulando un mecanismo de retroalimentación positiva que promovería la propagación de la marca durante el ciclo celular (Hansen et al. 2008; Margueron et al. 2008).

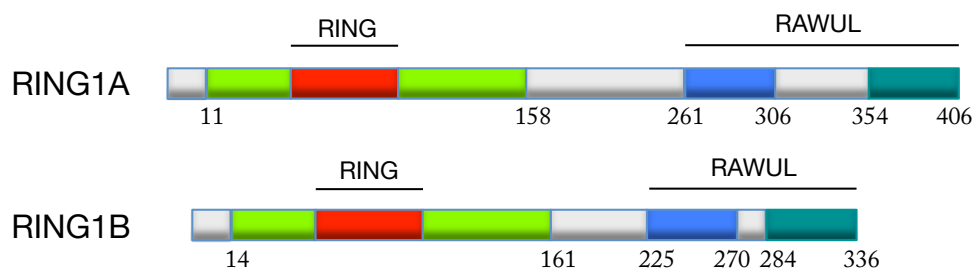
### 3.4 Relación entre PRC1 y PRC2

Mediante un modelo de reclutamiento jerárquico de PRC1 y PRC2 descrito en *D. melanogaster*, el reclutamiento *de novo* de PRC2 a sus sitios diana, catalizaría la trimetilación de H3K27, a la que se uniría el PRC1 a través del cromodominio de la subunidad CBX, facilitando la monoubiquitinación de H2AK119. Basándose en la conservación de las proteínas CBX y la evidencia de que la unión de PRC1 es sensible a la pérdida de PRC2 (Leeb et al. 2010; Tavares et al. 2012), este modelo ha sido ampliamente aceptado en mamíferos. Sin embargo, tanto subunidades PRC1 como la H2AK119Ub solo colocalizan parcialmente con sitios enriquecidos en PRC2 o H3K27me3 (Ku et al. 2008). Además la H2AK119Ub o el reclutamiento de RING1B al cromosoma X silenciado se ve poco afectada por la pérdida de H3K27me3 (Leeb et al. 2010; Schoeftner et al. 2006; Tavares et al. 2012). Estas observaciones apoyarían la existencia de un mecanismo de reclutamiento de PRC1 alternativo. De hecho, descubrimientos recientes apuntan a un reclutamiento de PRC2 dependiente de PRC1 y del reconocimiento de H2AK119Ub (Blackledge et al. 2014.). En este modelo alternativo, el evento inicial sería la unión a cromatina de una variante de PRC1 que contiene RYBP en lugar de CBX, donde catalizaría la formación de H2AK119Ub independientemente de la actividad PRC2. A través de estudios *in vitro*, este nuevo mecanismo de reclutamiento parece tomar parte en la represión de sitios diana naturales ya que la falta de PRC1 y H2AK119Ub causa una disminución sustancial de la unión de PRC2 a lo largo del genoma. Estudios *in vitro* han identificado además un tipo de complejo PRC2 que contiene las proteínas JARID y AEBP2, que se une preferentemente a cromatina que posee la marca H2AK119Ub (Kalb, Latwiel, et al. 2014), catalizando la formación de H3K27me3, proporcionando así un posible nexo entre la actividad de PRC1 y el reclutamiento de PRC2.

## 4. RING1A Y RING1B, LAS PROTEÍNAS LIGASAS QUE DEFINEN PRC1

RING1A y RING1B fueron identificadas en estudios de los complejos PcG en mamíferos mediante ensayos de doble híbrido en levaduras por su capacidad de interacción con el dominio de represión transcripcional de M33/CBX2 (Schoorlemmer et al. 1997). El cDNA aislado de *Ring1A* resultó ser idéntico al producto de uno de los genes conocidos como “Really Interesting New Genes”, transcritos identificados en el complejo mayor de





**Figura 3.** Esquema de las proteínas RING1. En colores se muestran los dominios de homología. Los números representan los residuos de aminoácido del extremo amino al carboxilo.

histocompatibilidad (Hanson et al. 1991; Lovering et al. 1993; Saurin et al. 1996). Contrariamente a lo sucedido con el resto de subunidades PcG, la caracterización de RING1A y RING1B tuvo lugar en vertebrados antes de la caracterización de sus homólogos SCE en *Drosophila* (Fritsch, Beuchle, and Müller 2003; Gorfinkel et al. 2004).

Los genes *Ring1A* y *Ring1B* codifican proteínas de 406 y 336 aminoácidos respectivamente, presentando un 67% de identidad entre ellas (Schoorlemmer et al. 1997). La comparación de ambas proteínas reveló dos dominios proteicos conservados. El primero se encuentra en el extremo amino terminal, que contiene una región rica en residuos de cisteína conservada en otras muchas proteínas al que se denominó RING finger (Lovering et al. 1993). Este dominio consta de tres láminas beta antiparalelas, una alfa hélice y dos bucles de unión a  $Zn^{2+}$ , necesarios para su correcto plegamiento (Borden 2000). El segundo dominio contiene dos regiones de identidad de las proteínas RING1 que forman el llamado dominio RAWUL (por Ring-finger And WD40 associated Ubiquitin-Like) (Sanchez-Pulido et al. 2008). Este dominio constituye una región esencial para la unión a otras subunidades PcG como CBX y RYBP (Schoorlemmer et al. 1997; Garcia et al. 1999)

#### 4.1 Ubiquitinación mediada por RING1A y RING1B

La ubiquitinación de proteínas es llevada a cabo a través de una cascada enzimática formada por las enzimas E1, E2 y E3. Mediante un proceso secuencial la E1 activa y transfiere la ubiquitina a la E2 conjugadora, tras lo cual, de forma dependiente de la E3, la ubiquitina se une a un residuo de lisina de la proteína diana. La familia de las proteínas E3 ligasas RING, a la cual pertenecen RING1A y RING1B de PRC1, sirven de unión entre la E2

y la proteína a ubiquitinar, de forma que acercan el residuo de lisina diana al sitio activo de la E2, permitiendo la catálisis (Kerscher et al. 2006). El dominio RING de las proteínas RING1A y RING1B está implicado en la unión de la E2 ligasa, y es el responsable de la actividad E3 ligasa de H2A del complejo PRC1. Este dominio se encuentra también en proteínas PCGF que actúan como cofactores de la reacción de ubiquitinación, por lo que la E3 ligasa de PRC1 funciona como una ligasa heterodimérica, formada por uno de los parálogos RING1 junto con una proteína PCGF (Napoles et al. 2004).

Aunque la E2 ligasa con la que interacciona PRC1 no está identificada *in vivo*, el dímero E3 ligasa RING1B-BMI1 puede interaccionar *in vitro* con varias E2 ligasas entre las que se encuentra UbcH5c (Buchwald et al. 2006). La ubiquitinación mediada por PRC1 se restringe a la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119Ub). La resolución de la estructura cristalográfica del complejo nucleosoma con RING1B-BMI1 y la E2 ligasa UbcH5c, determinó que la especificidad de ubiquitinación del residuo 119 de H2A se debe a la conformación que adquieren los RING fingers de RING1B-BMI1 y la E2 sobre la superficie del nucleosoma. Así la orientación precisa de la E2 viene dada por la unión de RING1B-BMI1 al parche ácido del nucleosoma, determinando que solo la lisina 119 quede lo suficientemente cerca del centro activo de la E2 para ser ubiquitinado. (McGinty, Henrici, and Tan 2014).

La ubiquitinación de H2A se ha relacionado con represión transcripcional, ya que mutaciones en RING1B causan la pérdida de H2AK119Ub y la pérdida de represión de los genes Hox (Cao, Tsukada, and Zhang 2005; Wang et al. 2004). Del mismo modo, la ubiquitinación de un cromosoma X en las hembras de mamíferos participa de su silenciamiento durante el proceso de compensación de dosis génica (Napoles et al. 2004; Fang et al. 2004). Además, la inactivación de enzimas deubiquitininasas específicas de H2A, como Usp16, resulta en represión transcripcional (Gu et al. 2015) y aumento de los niveles de H2AK119Ub en los nucleosomas próximos al promotor (Zhu et al. 2007). El balance entre la actividad de la E3 ligasa de PRC1 y las deubiquitininasas de H2A determina la rápida dinámica de la modificación, como demuestra la ausencia casi total de ubiquitina tras un tratamiento con un inhibidor de la actividad E3 ligasa de RING1B (Alchanati, 2009).

Sin embargo, existen evidencias de represión génica independiente de ubiquitinación de H2A. Tal es el caso del estudio de los genes Hox en células madre embrionarias de ratón, en

el que la represión génica se daría mediante un proceso mediado por RING1B en compactación de cromatina, independientemente de la ubiquitinación de H2A (Eskeland et al. 2010).

Además de su capacidad de ubiquitinar H2A, RING1B se encuentra en su forma activa en un estado de auto-ubiquitinación (Ben-Saadon et al. 2006) ya que cuando es ubiquitinado por otras E3 ligasas externas se destina a degradación proteosomal (Zaaroor-Regev et al. 2010). El residuo de auto-ubiquitinación coincide con el residuo que se ubiquitina por otras ligasas, lo que hace que ambas modificaciones sean mutuamente excluyentes. Así, la estabilidad o degradación de RING1B viene determinada tanto por la abundancia de E3 ligasas como de la del mismo RING1B (Nguyen et al. 2011).

## **4.2 Funciones transcripcionales de RING1A y RING1B**

La generación de los linajes celulares durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de los tejidos en el organismo adulto dependen de la capacidad de autorrenovación de células madre embrionarias y adultas (Weissman 2000). La autorrenovación combina la habilidad de proliferar con la conservación de la pluripotencia, permitiendo el desarrollo y el reemplazamiento celular en determinados tejidos adultos (Morrison and Kimble 2006). Por tanto la homeostasis celular depende de un adecuado balance entre la autorrenovación de las células madre, la regulación de su proliferación y diferenciación terminal (Molofsky and Pardal 2004). El potencial de desarrollo es máximo en las células madre embrionarias, mientras que en las fetales o de tejidos adultos dan, en general, un número más reducido de tipos celulares (Weissman 2000, Mimeault 2006).

Se ha descrito la participación de PcG en el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación y pluripotencia tanto en células madre adultas como embrionarias, aunque los genes diana varían en cada etapa. Así, la regulación génica mediada por PcG otorga a cada tipo celular su identidad mediante el control de la expresión de genes de proliferación y diferenciación (Mohn et al 2008, Boyer et al 2006, Lee et al 2006, Bracken et al 2006).

### 4.2.1 Desarrollo embrionario y mantenimiento de células madre

Las proteínas PcG, incluyendo RING1A y RING1B, participan en la especificación del eje antero-posterior de los individuos durante el desarrollo embrionario (Duncan 1982, Lewis 1978). Ambos parálogos presentan redundancia funcional, como se demuestra en estudios con células neurales embrionarias (Román-Trufero et al. 2009) o los embriones preimplantacionales (Posfai et al. 2012). De la misma manera, aunque los niveles globales de H2AK119Ub se ven afectados por la inactivación de cualquiera de los dos parálogos, solo se reducen drásticamente cuando ambos son inactivados (Napoles et al. 2004). Sin embargo, RING1A y RING1B presentan redundancia asimétrica entre ellos, ya que la inactivación constitutiva de *Ring1A* en ratón va acompañada de alteraciones del desarrollo compatibles con la formación de tejidos y la vida adulta (del Mar Lorente et al. 2000), mientras que la inactivación génica de *Ring1B* resulta en un fenotipo de letalidad desde muy temprano en la embriogénesis (Voncken et al. 2003).

Las proteínas PcG actúan como reguladores de la capacidad de autorenovación, y por tanto de su manteniendo tanto en células madre embrionarias como fetales (Valklingbeek 2004). Tanto RING1A como RING1B participan en la represión de numerosos genes de desarrollo (Leeb and Wutz 2007; Endoh et al. 2008). Sin embargo, la deficiencia de RING1A altera levemente los patrones de expresión comparado con la deficiencia de RING1B, de forma comparable a la diferencia de magnitud del fenotipo en embriogénesis (del Mar Lorente et al. 2000). Cuando se eliminan ambos homólogos se produce una mayor desrepresión de sus genes diana provocando una diferenciación espontánea asociada a una falta de proliferación (Endoh et al. 2008). Además, en ausencia de RING1B se produce una diferenciación neuronal prematura de las células madre neurales, lo que apoyaría la evidencia de la participación de las proteínas RING1 al mantenimiento de las células madre impidiendo su diferenciación (Román-Trufero et al. 2009).

### 4.2.2 Relación de RING1A y RING1B con ciclo celular y transformación tumoral

La inactivación de RING1B produce fenotipos combinados de diferenciación y proliferación celular. Este último, relacionado con la capacidad de las proteínas RING1 para reprimir la expresión de inhibidores de progresión de ciclo celular que impiden la actividad de las kinasas dependientes de ciclina (CDKs, cyclin dependent kinase). Tal es el caso de los

inhibidores codificados por el locus *Ink4/Arf* (Bracken et al. 2007; Calés et al. 2008;). De hecho, existe evidencia de correlación entre la unión de RING1B y otras proteínas PcG al promotor del locus *Ink4/Arf*, y su represión (Gil and Peters 2006, Maertens et al. 2009). Los supresores tumorales codificados por esta región son p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup>, ambos implicados en el punto de control de ciclo de la transición G1/S, a través de la ruta mediada por retinoblastoma (Rb). Este locus aparece frecuentemente silenciado por metilación de DNA en distintos tipos de cancer. De acuerdo con esto, los niveles de RING1A y RING1B, así como de otras proteínas PcG aparecen aumentados en varios tipos de tumores (Sanchez-Beato et al 2004 y 2006, Dukers et al. 2004, van Leenders et al. 2007), asociado con un pronóstico desfavorable en tumores humanos (Glinsky et al 2005).

### 4.3 Funciones no transcripcionales de RING1A y RING1B

Análisis proteómicos de complejos que contienen RING1B han identificado gran número de proteínas no pertenecientes a PcG asociadas a RING1B (Sánchez et al. 2007) sugiriendo la existencia de funciones adicionales de las proteínas RING1 en función de las proteínas con las que forme complejo. La ubiquitinación de H2A desempeña funciones tanto en represión transcripcional (Cao, Tsukada, and Zhang 2005; Wang et al. 2004) como en señalización de daño a DNA (Bergink et al. 2006; Nicassio et al. 2007; Doil et al. 2009), abriendo la posibilidad de que la E3 ligasa de PRC1 esté implicada en la respuesta de daño a DNA. Esta hipótesis ha sido demostrada por diversos laboratorios, que describen una participación de proteínas pertenecientes a PcG en la respuesta de daño a DNA o DDR (DNA damage response). Se ha observado que existe un reclutamiento de subunidades Polycomb, incluidas RING1A y RING1B, junto con su cofactor BMI1 a roturas inducidas mediante irradiación (Chou et al. 2010; Ginjala et al. 2011), participando probablemente en la señalización primaria de la respuesta y su posterior amplificación (Lukas et al. 2011; Vissers et al. 2012; Bergink et al. 2006). De hecho, RING1B y BMI1 han sido implicados en la monoubiquitinación de  $\gamma$ H2AX, como un paso previo al ensamblaje y reclutamiento de proteínas de daño a DNA (Pan et al 2011; Ginjala et al. 2011). Sin embargo el mecanismo subyacente no está claro, debido a la existencia de evidencias contradictorias: por ejemplo, en el caso de BMI1 su reclutamiento ha sido descrito tanto dependiente como independiente de la actividad de poly(ADP-ribosyl) polymerase (PARP) (Chagraoui et al. 2011; Ginjala et al.

2011). Probablemente la causa de las discrepancias descritas se deban a la participación a través de distintos mecanismos dependientes de contexto.

De manera consistente con la existencia de funciones no transcripcionales de RING1B, la inactivación conjunta de *Ink4a/Arf* y *Ring1B*, no restaura la letalidad embrionaria provocada en ausencia de RING1B (Voncken et al. 2003). De hecho, se han observado defectos durante la replicación de DNA en embriones de dos células (Posfai et al. 2012) y fibroblastos embrionarios inmortalizados (Piunti et al. 2014) deficientes en RING1A y RING1B. Además, durante la elaboración de esta tesis se publicó un trabajo que muestra perfiles proteómicos en cromatina naciente o en cromatina madura en los que aparecen las proteínas Polycomb RING1A y RING1B unidas a ambos tipos de cromatina (Alabert et al. 2014).

## **OBJETIVOS**





### OBJETIVOS:

1. Caracterizar la actividad de las proteínas RING1 en progresión de ciclo celular.
2. Establecer un modelo celular que permita estudiar, en condiciones basales de cultivo, el papel de RING1 en la replicación y el daño a DNA asociado al proceso.
3. Investigar la participación de RING1 en la sensibilidad y la respuesta al daño a DNA por estrés replicativo.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. CULTIVOS Y TRATAMIENTOS CELULARES

### 1.1 Fibroblastos embrionarios

Los fibroblastos embrionarios (MEFs) fueron derivados de embriones de ratón a día 13,5 post-coital provenientes de las líneas murinas indicadas en cada caso. Para ello, tras remover las vísceras y la cabeza, el tejido embrionario fue disgregado durante 45 minutos a 37°C con tripsina 0.05%-EDTA (Invitrogen). Las células resultantes fueron amplificadas en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos, para su posterior congelación a -80°C. Los MEFs fueron derivados de ratones *Ring1A*<sup>-/-</sup>, *Ring1B*<sup>fl/fl</sup>, *Polr2a:Cre-ERT2*. Para los experimentos en los que se usaban fibroblastos deficientes en CDKN2a,b, la línea murina anterior fue cruzada con ratones *Ink4ab*<sup>-/-</sup> (Krimpenfort et al. 2007). Los MEFs fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para la inactivación *in vitro* de RING1B, los MEFs se siembran a tiempo 0, 24 horas después se añade al cultivo 10 µM de 4-hidroxitamoxifeno (4'-OHT) diluido en etanol (EtOH). El tratamiento con 4'-OHT induce la translocación al núcleo de la recombinasa Cre-ER, que se encuentra inactiva en el citoplasma. Como control del sistema se usaron MEFs tratados sólo con EtOH. Después de 16 horas, se reemplaza el medio con EtOH/4'-OHT por medio fresco. La inducción de estrés replicativo en MEFs se realizó mediante la adición al cultivo de 2 mM hidroxihurea (HU) durante una hora en todos los casos, a excepción de la detección de RAD51 en recombinación homóloga, donde fue 2 mM HU durante 24 horas.

### 1.2 Líneas celulares establecidas

- Células HeLa: línea celular inmortalizada derivada de epitelio de adenocarcinoma de cérvix humano. La inducción de estrés replicativo en estas células se realizó con tratamientos de 4 mM HU durante una hora.

- Células HEK293T: línea celular derivada de epitelio de riñón embrionario humano. Estas células expresan constitutivamente el antígeno *Large T* del virus 40 de simios (SV40).

- Células 293T PlatinumE: línea celular empaquetadora de retrovirus basada en la línea 293T. Estas células portan los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican para la estructura viral bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  (Morita, Kojima, and Kitamura 2000)

- Células 293T BirA-bioRING1B: Es un transfectante estable generado en el laboratorio. En primer lugar las células fueron transfectadas con un plásmido que expresa BirA, una biotín ligasa de *Escherichia coli*. Cuatro de estas líneas fueron transfectadas con un segundo plásmido que contiene el cDNA de *RING1B* extendido con secuencias que codifican un péptido de 23 aminoácidos biotinilable fusionado a su extremo N-terminal. Una de las poblaciones así generadas fue seleccionada por su grado eficiente de biotinilación de RING1B que se expresa a niveles comparables a los del gen endógeno.

Las líneas celulares descritas anteriormente han sido crecidas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C.

## **2. ANALISIS DE LA PROLIFERACIÓN, REPLICACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR**

### **2.1 Curva de acumulación celular**

Para la realización del ensayo de acumulación de células, fueron sembradas a día 0 a una densidad que permitiera un crecimiento exponencial durante todo el experimento (sin alcanzar confluencia). Para ello  $8 \times 10^4$  células fueron sembradas en placas de 6 cm por duplicado y tripsinizadas para su conteo cada 2 días hasta alcanzar el día 10 de cultivo.

### **2.2 Marcaje de células replicativas**

El análisis de la replicación se realizó mediante la adición del análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) que se incorpora al DNA durante la síntesis (Salic 2008). Las células fueron sembradas en placas 6 cm sobre cubrecristales a una densidad de  $10^5$  células por placa. Tras el tratamiento correspondiente con EtOH/4'-OHT las células fueron pulsadas con 10  $\mu$ M EdU durante el tiempo indicado en cada caso.

## 2.3 Análisis bidimensional del ciclo celular

Las células fueron pulsadas *in vivo* con 10  $\mu$ M EdU durante 10 minutos, fijadas con EtOH al 70% y mantenidas durante la noche a -20°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas tres veces en PBS y procesadas según el protocolo de detección de EdU, Click-iT Alexa Fluor 647 para citometría de flujo. Posteriormente se añadió el intercalante de DNA yoduro de propidio a una concentración de 5  $\mu$ g/ml para la tinción del DNA. Las células fueron entonces adquiridas en un citómetro FACS Canto (Becton Dickinson). Los datos se analizaron usando el software FlowLogic (Inivai Technologies).

## 2.4 Medida de la apoptosis

Las fracción de células apoptóticas fue cuantificada mediante el Kit de detección de apoptosis Anexina V conjugada con el fluorocromo FITC (fluoresceína-5-isotiocianato, Bender MedSystems). Tras 48 horas de tratamiento con EtOH/4'-OHT las células fueron tripsinizadas, lavadas una vez en PBS seguido de otro lavado en buffer de unión. Después, 0.1 ml de células a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml fueron incubadas 10 minutos a temperatura ambiente en buffer de unión conteniendo 5  $\mu$ l de Anexina V-FITC. Tras los lavados, 5  $\mu$ l de solución de tñido con yoduro de propidio fue añadida a las células para su posterior adquisición con el citómetro FACS Canto (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados usando el software FlowLogic (Inivai Technologies). También se cuantificó la apoptosis mediante inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-Caspasa 3 activa (Promega).

# 3. ENSAYOS DE COMPLEMENTACIÓN CELULAR E INACTIVACIÓN DE *Cdkn1a/p21*

## 3.1 Plásmidos utilizados

Los vectores retrovirales fueron basados en el plásmido pMSCV en el que los cDNAs de *RING1B* silvestre o mutantes fueron subclonados corriente abajo del promotor del virus de células madre murinas (MSCV LTR, murine stem cell virus long terminal repeat). El mutante de *RING1B* de actividad E3 ligasa (IL53,55A,A;  $\Delta$ E3) y el que presenta una delección de 33

aminoácidos en el extremo amino terminal ( $\Delta 1-33$ ) fueron generados mediante PCR, de tipo solapante en el caso del  $\Delta E3$ , y posteriormente secuenciados.

Los plásmidos de inactivación lentiviral de las proteínas RING1 fueron basados en el plásmido pLKO (expresión constitutiva de los shRNAs de *RING1A* y controles) o en el plásmido pTRIPZ de expresión inducible por doxiciлина (shRNA de *RING1B* y plásmidos de sobreexpresión de mutantes de RING1B). El plásmido shRNAmir (microRNA-adapted shRNA) de *RING1B* fue obtenido de Thermo Scientific. La expresión de este plásmido genera un shRNA cuya diana se encuentra en la región 3'-UTR del mRNA de *RING1B*. Para los ensayos de complementación la secuencia codificante de la proteína reportera TurboRFP del plásmido shRNAmir de *RING1B* fue intercambiado por los cDNAs de los mutantes de *RING1B*.

Los cDNAs de las proteínas de fusión MBD1-RB fueron obtenidos de S. Cooper (Cooper et al. 2014).

Para la inactivación de *Cdkn1a/p21*, se usó el plásmido lentiviral FUGW-H1 (Fasano et al. 2007)

### 3.2 Obtención de partículas virales

Las partículas retrovirales fueron obtenidas mediante transfección en células empaquetadoras 293T-PlatinumE con plásmidos basados en pMSCV. Brevemente, las transfecciones se realizaron sobre  $3 \times 10^6$  células en placas de 10 cm con 10  $\mu$ g de plásmido acompañado con el reactivo de transfección Turbofect (Thermo Scientific). Para la generación de partículas lentivirales, 7.5  $\mu$ g del plásmido de interés fue co-transfectado en células HEK293T con 4.8  $\mu$ g de plásmido empaquetador psPAX2 y 2.6  $\mu$ g del plásmido de envuelta pMD2G (plásmidos Addgene # 12260 y 1259, respectivamente). Para ambos tipos de virus, los sobrenadantes virales fueron recogidos 48, 60 y 72 horas después de la transfección, y después de filtrarlos a través de una membrana de PVDF 0.45  $\mu$ m, fueron alicuotados y congelados a  $-80^\circ$  hasta su uso.



### 3.3 Transducción celular

Las células fueron crecidas en cubrecristales a una densidad de  $1 \times 10^5$  células en una placa de 6 cm (MEFs) o a  $5 \times 10^6$  células en una placa de 10 cm (células HeLa). Ambos tipos celulares fueron incubados con los sobrenadantes virales diluidos 1:2 en medio fresco con polibreno a una concentración de 4  $\mu\text{g/ml}$ . El medio viral fue sustituido con medio fresco 16 horas después. En el caso de MEFs, al día siguiente el medio es reemplazado por medio de selección con 1.1  $\mu\text{g/ml}$  de puromicina para después de 48 horas, ser tratadas con EtOH y 4'-OHT. En el caso de las células HeLa tras la retirada del medio viral, fueron seleccionadas durante 96 horas con medio conteniendo blasticidina (5  $\mu\text{g/ml}$ ), o medio con blasticidina y puromicina (5  $\mu\text{g/ml}$  y 3  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente). Las células transducidas con virus pTRIPZ fueron entonces tratadas con medio con doxiciclina (2  $\mu\text{g/ml}$ ) durante las 48 horas previas al análisis.

## 4. INMUNOFLUORESCENCIA

### 4.1 Procesamiento de las muestras

Las células fueron crecidas en cubrecristales y tras el tiempo indicado en cada caso, fijadas en 4% paraformaldehído (PFA) durante 15 minutos, permeabilizadas en 0.5% Triton X-100 en Tween20-PBS (TPBS) y bloqueadas durante 30 minutos en TPBS con 10% suero de cabra y 1% gelatina de piel de pez de agua fría (Sigma) (buffer de bloqueo). Para el análisis de proteínas de replicación, las células fueron pre-extraídas para la eliminación de proteínas solubles, en 10 mM Pipes, pH 7.4; 100 mM NaCl; 300 mM sacarosa; 3 mM  $\text{MgCl}_2$  conteniendo 0.5% (v/v) Triton X-100 durante 5 minutos, antes de la fijación con PFA.

Los cristales fueron incubados con los anticuerpos primarios (Tabla 1) indicados en cada caso diluidos en buffer de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Después de tres lavados en TPBS, los cristales fueron incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos Alexa (Alexa Fluor 488, 568 o 647) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados en TPBS, el DNA fue teñido con DAPI diluido en TPBS durante 5 minutos, y después de un lavado adicional fueron montados en portaobjetos usando medio de montaje Mowiol (Calbiochem).

Para la detección de la incorporación de los análogos de timidina 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) y 5-yodo-2'-desoxiuridina (IdU), las células fueron pulsadas con 10  $\mu$ M EdU y/o 25  $\mu$ M IdU durante los tiempos indicados en cada experimento y fijados en 4% PFA durante 15 minutos. La presencia de EdU fue analizada mediante el kit de análisis Click-iT EdU Alexa Fluor 488 o 647 (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Esta técnica de detección está basada en una reacción de click (Breinbauer 2003, Wang 2003), reacción covalente catalizada por cobre entre una azida y una alquina. En esta aplicación, el grupo alquino lo contiene el EdU, mientras que el grupo azida está presente en el fluorocromo Alexa-fluor. Las ventajas de esta técnica con respecto al uso del análogo de nucleótidos BrdU, radican en el pequeño tamaño del fluorocromo-azida, que hace innecesario la desnaturalización del DNA para la detección del análogo de timidina.

La tinción de IdU fue realizada después de 15 minutos en 4% PFA, una permeabilización en 0.5% Triton X-100 y desnaturalización del DNA en 2 M HCl durante 20 minutos. En los experimentos de pulso y caza EdU-IdU la tinción de IdU fue previa a la detección del EdU.

## 4.2 Adquisición y análisis de imagen

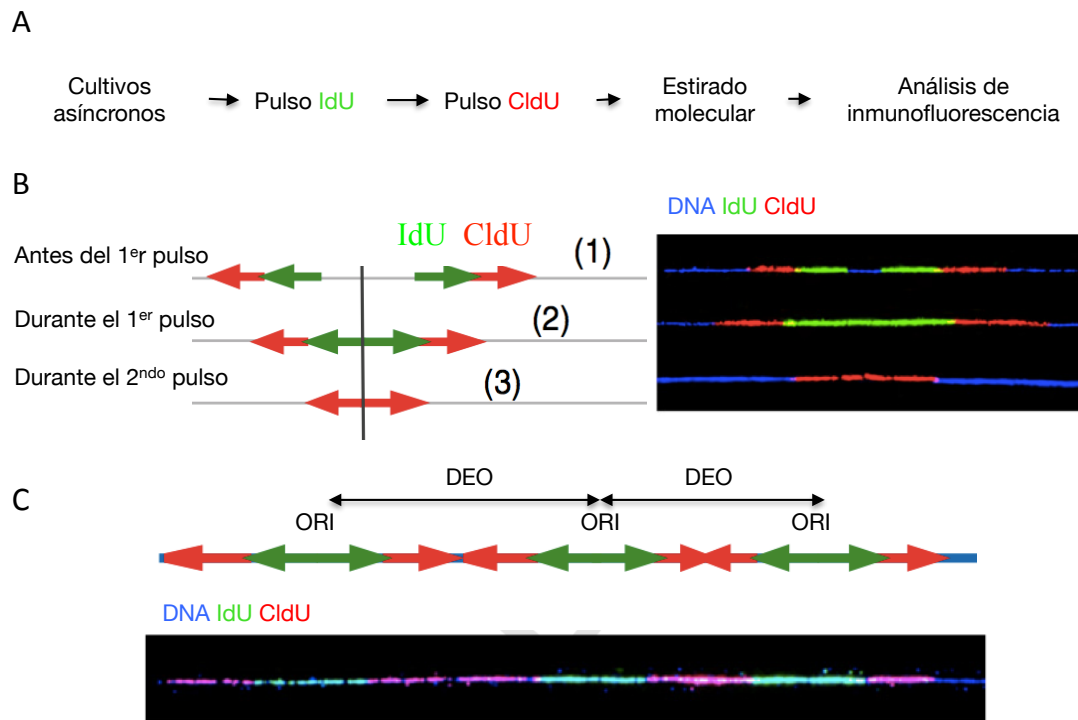
Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas usando una cámara digital Leica DFC 350 FX CCD montada sobre un microscopio invertido Zeiss Axioplan. Las imágenes adquiridas de cada experimento fueron tomadas a iguales tiempos de exposición y se analizaron cuantitativamente usando el software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Todas las imágenes mostradas son representativas de cada caso y pseudo-coloreadas de acuerdo con la longitud de onda de emisión de cada fluoróforo.

Las imágenes confocales fueron adquiridas usando un microscopio LEICA TCS-SP5-AOBS con un objetivo de aceite de inmersión de 63x HCX PL APO. Para el análisis de estas imágenes los núcleos fueron delineados usando el DAPI como referencia y copiados al correspondiente canal de fluorescencia. Los núcleos fueron contados y se realizaron medidas de intensidad de fluorescencia o de número de puntos por núcleo. El fondo o ruido de las imágenes fue determinado en preparaciones sin anticuerpo primario y la señal obtenida fue restada de la imagen a analizar, de forma que solo se cuantificara la "señal verdadera"

mediante la herramienta "Find maxima" del software ImageJ. Para los análisis de colocalización, al menos 5 planos confocales-Z por célula adquiridos cada 0.5  $\mu\text{m}$  fueron analizados usando LAS AF software (Leica).

## 5. ANÁLISIS DE FIBRAS DE DNA

Este tipo de análisis estudia la replicación del DNA a nivel molecular a escala genómica analizando fibras de DNA individuales. Permite medir la velocidad de síntesis de del DNA, la asimetría presente en los orígenes de replicación y la distancia entre ellos, dando información además acerca de los eventos de iniciación (figura 4).



**Figura 1:** Principios del análisis dinámico de la replicación. (A) Esquema del protocolo usado para el doble pulso en horquillas de replicación de cultivos asíncronos. (B) La sucesión de pulsos de IdU y CldU permite la identificación de orígenes replicando o eventos de iniciación. Las flechas verdes y rojas corresponden a DNA de nueva síntesis marcado con IdU o CldU respectivamente. Se muestran ejemplos de fibras de DNA con los distintos patrones de iniciación. Azul: DNA; verde: IdU; rojo: CldU. (C) Ilustración del análisis de la distancia entre orígenes (DEO): distancia que separa dos eventos de iniciación.

Para este análisis, 48 horas después de la adición de 4'-OHT al cultivo, los MEFs fueron pulsados con los análogos de timidina IdU (25  $\mu\text{M}$ ) y CldU (200  $\mu\text{M}$ ) durante los tiempos indicados en cada experimento. Se prepararon bloques de agarosa con  $4 \times 10^4$  células por bloque, y las fibras de DNA fueron inmediatamente extraídas tras los pulsos y estiradas sobre

cubrecristales silanizados. Las moléculas de DNA fueron teñidas con un anticuerpo anti DNA de cadena sencilla (MAB3034, Chemicon; 1/500) y una IgG anti-ratón acoplada a Alexa 547 (A11030, Molecular Probes, 1/50). El CldU y el IdU fueron detectados con BU1/75 (AbCys, 1/20) y BD44 (Becton Dickinson, 1/20) anticuerpos anti BrdU. Las fibras de DNA fueron analizadas en un microscopio Leica DM6000 equipado con una cámara DFC390 (Leica). La adquisición de los datos se realizó con el software LAS AF (Leica).

## **6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA Y qPCR**

La cromatina de MEFs fue entrecruzada mediante la incubación de las células en 1% formaldehído durante 15 minutos seguido de su neutralización con 0.125 M glicina. Después de 3 lavados con PBS, las células fueron levantadas y resuspendidas en buffer LB1 (50 mM Hepes, pH 7.4; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% glicerol; 0.5% NP40; 0.25% Triton X-100). Después de 5 minutos de incubación en este buffer, las células fueron centrifugadas a 1350 x g durante 5 minutos y los pellets fueron resuspendidos en buffer LB2 (10 mM Tris-HCl, pH 8; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0.5 mM EGTA), incubados a 4°C, 5 minutos y centrifugados a 1350 x g durante 5 minutos. Los pellets fueron resuspendidos en buffer LB3 (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% deoxicolato, 0.5% laurilsarcosina) y después de 25 minutos de incubación a 4°C fueron sonicados durante 4 ciclos de 30 segundos a alta intensidad (Bioruptor, Diagenode). Los lisados sonicados fueron centrifugados 10000 x g por 10 minutos. 100-200 µg de cromatina fueron incubados con los anticuerpos indicados durante la noche. Al día siguiente los inmunocomplejos fueron aislados mediante su unión a 15 µl de suspensión de bolas paramagnéticas de proteína G (Life Technologies), bloqueadas previamente en 0.5% BSA (p:v) en PBS, durante 2 horas en rotación a 4°C. La cromatina inmunoprecipitada fue lavada 2 veces en un buffer de baja sal (20 mM Tris-HCl, pH 8.1; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% SDS), una vez en alta concentración de sal (20 mM Tris-HCl, pH 8.1; 500 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; 0.1% SDS) y una vez más en buffer de LiCl (10 mM Tris-HCl, pH 8.1; 250 mM LiCl; 1 mM EDTA; 1% deoxicolato; 1% NP-40). Para la elución del inmunoprecipitado, La proteína G fue hervida a 100°C en 50 mM Tris-HCl, pH 8.1; 10 mM EDTA; 1% SDS, durante 5 minutos y la cromatina eluída fue incubada durante la noche con 200 mM NaCl a 65°C. Después de un tratamiento con RNasa y proteinasa K el DNA fue aislado mediante extracción con fenol/

cloroformo y precipitación en etanol para la amplificación de DNA de satélite mayor mediante PCR cuantitativa a tiempo real (oligonucleótidos utilizados, Tabla 2). El enriquecimiento fue calculado por el método  $\Delta\Delta C_t$  usando como control la misma cantidad de DNA obtenida de una muestra de cromatina sin anticuerpo (solo bolas magnéticas).

## 7. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE mRNA (RT-qPCR)

EL RNA total de las células fue aislado usando la solución TRI-Reagent (Sigma Aldrich) según el protocolo proporcionado por la casa comercial. El RNA aislado fue sometido a transcripción reversa usando el sistema comercial de obtención de DNA complementario (cDNA) SuperScript VILO (Life Technologies). EL cDNA resultante fue analizado mediante PCR cuantitativa usando oligonucleótidos que amplifican las secuencias del satélite mayor. Los datos fueron analizados mediante el método de corrección por eficiencia usando el gen de la  $\beta$ -actina como transcrito para normalizar (oligonucleótidos utilizados, Tabla 2).

## 8. WESTERN BLOT

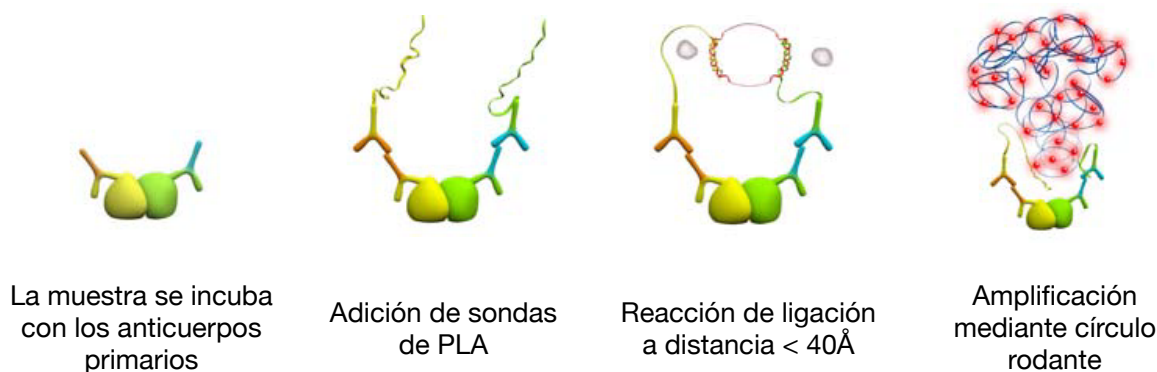
Los extractos totales de proteína fueron preparados mediante la lisis de las células en buffer RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7.2; 150 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100; 0.1% dodecil sulfato sódico (SDS); 1% deoxicolato sódico; 5 mM EDTA) suplementado con 20 mM NaF e inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Para los extractos de histonas, las células fueron lisadas en PBS conteniendo 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mM PMSF y 4 mM N-etil-maleimida. Los núcleos resultantes fueron incubados durante la noche en 0.2 N HCl a 4°C, y las histonas se recuperaron de la fracción soluble. Las proteínas resultantes de los diferentes extractos fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS del 10 o de 15% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Después de un bloqueo de media hora en leche al 5% en PBS con 0.1% Tween-20, las membranas fueron incubadas en los correspondientes anticuerpos primarios diluïdos en TTBS con BSA al 1% durante 1-2 horas a temperatura ambiente, o durante la noche a 4°C. Tras tres lavados en TTBS, las membranas fueron incubadas con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Dako) durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de luminiscencia se realizó usando el reactivo para western blot ECL Prime (GE Healthcare)

## 9. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

### 9.1 Ensayo de ligación por proximidad (PLA)

Esta técnica permite detectar interacciones entre proteínas en muestras celulares preparadas para microscopía de fluorescencia. Para ello se usan parejas de anticuerpos primarios que reconocen las proteínas de interés generados en especies diferentes, a los que se unirán oligonucleótidos acoplados con anticuerpos secundarios (sondas de PLA). Cuando las dos sondas unidas a los anticuerpos primarios queden a una distancia menor de 40Å, se generará una señal positiva de PLA, resultado de una reacción de amplificación de círculo rodante. Cada señal individual se visualiza como un punto fluorescente, pudiendo ser cuantificados mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.

Para la detección de interacciones directas proteína-proteína mediante PLA se utilizó Duolink II Detection Kit con sondas de PLA anti-ratón MINUS y anti-conejo PLUS, siguiendo las instrucciones del fabricante (Olink Bioscience). La detección del EdU incorporado se realizó después de las reacciones de PLA usando el Kit de imagen Click-iT EdU Alexa 488 (Life Technologies).



**Figura 2:** Principios del ensayo de ligación por proximidad (PLA)

### 9.2 Fraccionamiento subcelular y co-inmunoprecipitación

20 x 10<sup>6</sup> células HEK293T fueron tratadas con 4 mM HU durante 1 hora antes de lisarlas en buffer de sacarosa (10 mM HEPES, pH 7.9; 0.34 M sacarosa; 3mM CaCl<sub>2</sub>; 2 mM acetato de magnesio; 0.1mM EDTA) conteniendo 0.5% NP40 e inhibidores de proteasas (Roche). Los núcleos intactos fueron peleteados a 4000 x g durante 20 minutos, lavados en

buffer de sacarosa sin NP40 y lisados en buffer de extracción nucleoplásmico (20 mM HEPES, pH 7.9; 3 mM EDTA; 10% glicerol; 150 mM acetato potásico; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). El extracto nuclear resultante fue clareado por centrifugación 30 minutos a 15000 x g. Después, el pellet que contiene la cromatina fue incubado durante 30 minutos a 37°C en buffer de nucleasa [(150 mM HEPES, pH 7.9; 1.5mM MgCl<sub>2</sub>; 150mM KOAc; 0.3% NP-40 e inhibidores de proteasas (Roche)] suplementado con benzonasa a una concentración de 125 U/ml para solubilizar las proteínas unidas a cromatina. Tras la incubación, la fracción de cromatina fue clareada por centrifugación a 20000 x g durante 30 minutos. Previa retirada de un 10% del extracto a modo de “input”, la inmunoprecipitación fue realizada usando 1 mg de extracto de fracción de cromatina con 15 µl/mg de bolas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 de Thermo Scientific) previamente bloqueadas en 0.5% BSA durante 30 minutos a 4°C. Después de 2 horas de incubación a 4°C en rotación, las bolas de estreptavidina fueron lavadas 3 veces en buffer conteniendo 0.3 M NaCl y 0.5% NP-40. Tras los lavados, el inmunoprecipitado fue eluido a 100°C durante 5 minutos en buffer Laemmli para su posterior análisis mediante western blot.

## **10. EVALUACIÓN DEL DAÑO AL DNA: ENSAYO ALCALINO DE COMETAS**

Se trata de una electroforesis de células individuales embebidas en un microgel de agarosa que permite la evaluación del daño a DNA existente. El principio del ensayo se basa en la capacidad del DNA roto y desnaturalizado de migrar fuera del núcleo al someterlo a un campo eléctrico, mientras que el DNA no dañado migra menos o permanece dentro del núcleo. En esta tesis se ha trabajado con ensayos de cometas en condiciones alcalinas, que alcanzan una gran resolución permitiendo detectar pequeñas cantidades de daño tanto de doble cadena como de cadena sencilla (Angelis KJ, 1999). Para ello, tras la electroforesis, las células son teñidas con el intercalante de DNA SYBR green que permite la visualización y cuantificación de los fragmentos migrados mediante microscopía de fluorescencia.

En este trabajo se ha medido el parámetro “momento de cola”, que se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción de DNA total presente en la misma. De esta manera se incorpora la medición de los fragmentos más pequeños detectables (reflejados en

la longitud de la cola) y el número de los fragmentos relajados / rotos (representados por la intensidad del DNA en la cola)

Las lesiones en el DNA fueron detectadas usando el Kit comercial de ensayo alcalino de cometas (Trevigen Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la adquisición de las imágenes se tomaron campos aleatorios en las distintas condiciones de estudio y la posterior cuantificación de la magnitud de los cometas se realizó mediante el software Comet Score



**Tabla 1:** Anticuerpos utilizados

Proteína	Especie	Fuente	Uso	Clon
53BP1	Conejo	Novus Biological	IF	Policlonal
BRCA2	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	IF	Policlonal
BrdU (CldU)	Rata	AbCys	IF	BU1/75
BrdU (IdU)	Ratón	Becton Dickinson	IF	B44
CDKN1A/p21	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	IF, WB	F-5
CDKN2A2a/p16Ink4a	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	WB	M-156
FANCD2	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	ChIP	FL17
FANCD2	Conejo	Abcam	IF	EPR2302
FLAG-Tag	Ratón	Sigma	IF, PLA	M2
H2A	Conejo	Millipore	ChIP, WB	Policlonal
H2AK119Ub1	Conejo	Cell Signaling	IF, ChIP, WB	D2754
H3K27me3	Conejo	Cell Signaling	ChIP	C36B11
H3K9me3	Conejo	Diagenode	IF	Policlonal
p-Kap (pS824)	Conejo	Abcam	IF	Policlonal
p-RPA (pS33)	Conejo	Bethyl	IF	
PCNA	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	PLA	PC10
RAD51	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	IF, ChIP	Policlonal
Rad9	Conejo	Thermo Scientific	IF, WB, PLA	Policlonal
RFC5	Conejo	Santa Cruz Biotechnology	PLA	F9
RING1A	Conejo	(Schoorlemmer et al. 1997)	IF, WB	
RING1B	Conejo	Cell Signalling	ChIP	
RING1B	Conejo	(Garcia et al. 1999)	IF, WB, PLA	
RPA32	Rata	Cell Signaling	IF	4E+04

Lap2	Ratón	BD Transduction Laboratories	IF	27/Lap2
$\alpha$ -tubulina	Ratón	Millipore	IF	DM1A
$\alpha$ -tubulina	Ratón	Sigma	WB	B-5-1-2
$\gamma$ H2AX (Ser139)	Ratón	Biolegend	IF, WB	2F3

**Tabla 2:** Oligonucleótidos

Especie	Gen	Oligo	Secuencia	Uso	Referencia
Ratón	$\beta$ -actina	sentido	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	RT-qPCR	
		antisentido	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'		
	Satélite mayor	sentido	5'-TGGAATATGGCGAGAAACTG-3'	ChIP-qPCR RT-qPCR	Pinheiro et al. 2012
		antisentido	5'-AGGTCCTTCAGTGGGCATTT-3'		
	$\alpha$ -actina	sentido	5'-GCAGGCCTAGTAACCGAGACA-3'	ChIP-qPCR	
		antisentido	5'-AGTTTTGGCGATGGGTGCT-3'		
	Cdkn1a	sentido	5'-GGCTTAGATTCCCAGAGGG-3'	ChIP-qPCR	Lüdtke et al. 2013
		antisentido	5'-TTCTGGGGACACCCACTGG-3'		

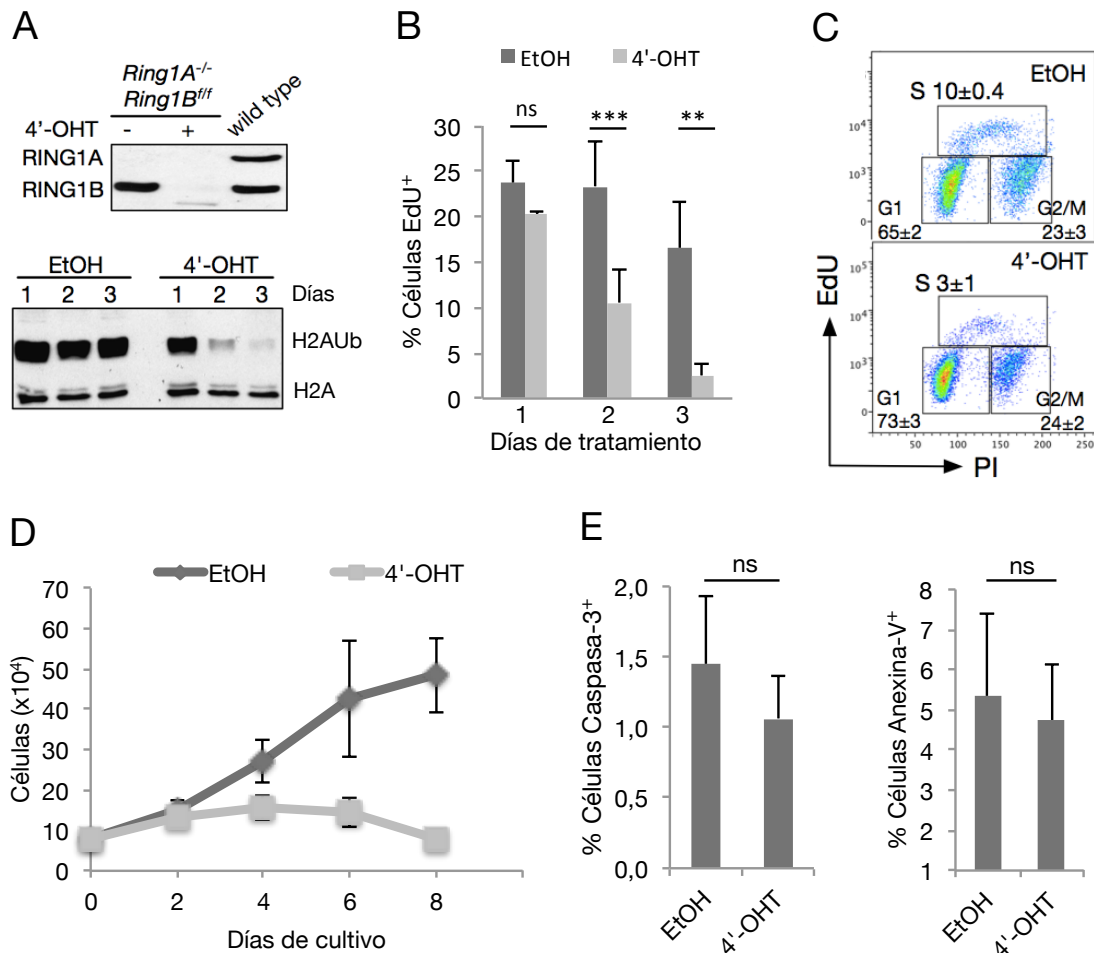
## **RESULTADOS**



# 1. RING1A Y RING1B EN PROGRESIÓN DE CICLO CELULAR

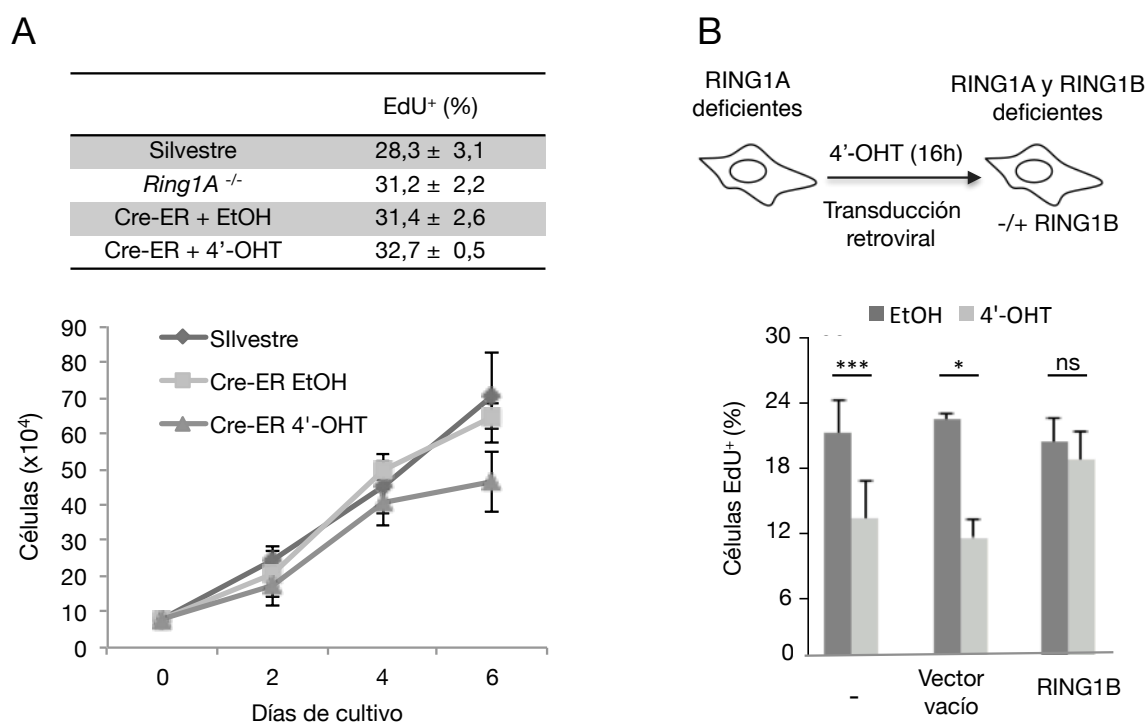
## 1.1 Fallo proliferativo en ausencia de proteínas RING1

Para facilitar el estudio de la(s) actividad(es) de las proteínas RING1 en la progresión del ciclo celular utilizamos un modelo celular que permite obviar la naturaleza letal de la



**Figura 6.** Arresto proliferativo en fibroblastos deficientes en proteínas RING1. A) Western Blots representativos de RING1A, RING1B en extractos celulares de proteína total y contenido en histonas en MEFs de los genotipos y tratamientos indicados. Extractos analizados con anti-RING1A, anti-RING1B, anti-H2AK119Ub y anti-H2A como control de carga. B) Replicación, medida como porcentaje de células que incorporan EdU en cultivos tratados con EtOH (células control) o 4'-OHT (células mutantes) tras el tiempo indicado. C) Análisis bidimensional del ciclo celular por incorporación de EdU y contenido en DNA mediante yoduro de propidio, 48 horas después de la adición del EtOH/4'-OHT al cultivo. D) Curva de proliferación celular en cultivos control (EtOH) y mutantes (4'-OHT) siendo día 0 el día de la adición de los tratamientos. E) Cuantificación de la apoptosis en MEFs control y mutantes mediante inmunodetección de Caspasa-3 activa y Anexina V mostrando una ausencia de incremento en células mutantes. Los gráficos de barras muestran media y desviación estándar. El número de replicados biológicos (líneas de fibroblastos derivadas de embriones independientes) en cada experimento fue n=8 (A, a excepción de 72 horas, n=2), n=2 (C, E), n=8 (D). \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.004$ ; ns, no significativo ( $p \geq 0.05$ ).

inactivación conjunta de los genes que codifican ambos productos. Se trata de fibroblastos embrionarios murinos (MEFs de murine embryonic fibroblasts) constitutivamente deficientes en RING1A (*Ring1A*<sup>-/-</sup>) y condicionalmente deficientes en RING1B (alelo floxeado, *Ring1B*<sup>ff</sup>). Estas células se derivaron de embriones de 13.5 d.p.c. resultantes de cruces de ratones *Ring1A*<sup>-/-</sup>, *Ring1B*<sup>ff</sup> en los que uno de los parentales portaba una cassette que expresa



**Figura 7.** El defecto proliferativo observado es específico de la ausencia de las proteínas RING1. (A) Arriba: análisis de la tasa de incorporación de EdU en fibroblastos de los genotipos y tratamientos indicados; abajo: curva de proliferación celular en MEFs de genotipo silvestre y Cre-ER. (B) Arriba: diseño experimental para la sobreexpresión de RING1B; abajo: análisis de la incorporación de EdU en un ensayo de complementación celular por reconstitución de la proteína RING1B silvestre mostrando rescate proliferativo. El gráfico muestra los resultados obtenidos de células sin transducir (-), transducidas con un vector retroviral vacío (vector vacío) o con un vector retroviral portador del cDNA de RING1B (RING1B). Los gráficos de barras muestran media y desviación estándar. n=2 (A), n=3 (B). \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.004$

la recombinasa Cre-ER (ver métodos), cuya actividad se modula mediante el control de su localización intracelular en presencia de 4'-OHT (nuclear, activa) o ausencia (citoplasmática, inactiva). En este sistema, los niveles de RING1B se reducen drástica y rápidamente, como muestra el Western Blot (referido en adelante como WB), de extractos totales de células tras 48 horas del tratamiento con EtOH o 4'-OHT (en adelante referidos como cultivos control y mutante respectivamente, figura 6A, arriba). Como era de esperar, los niveles de histona H2A

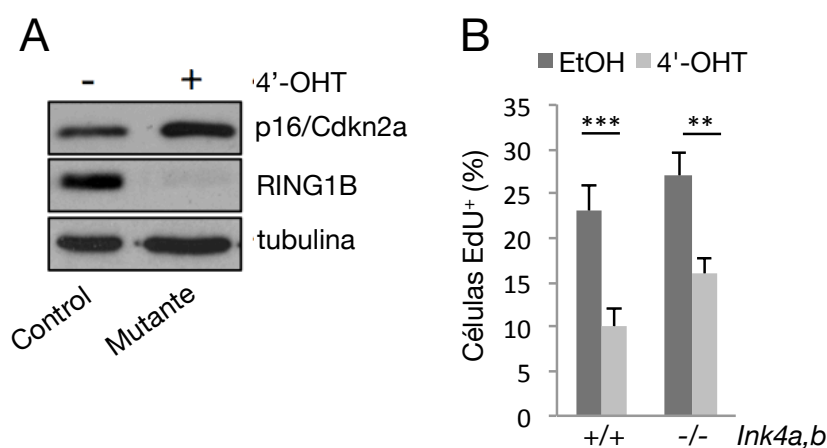
monoubiquitinada en la lisina 119 (H2AK119Ub) también disminuyeron en paralelo (figura 6A, abajo).

El uso de moléculas análogas de nucleótidos permite analizar la fase replicativa del ciclo celular. Como se muestra en la figura 6B, la proliferación medida como incorporación del análogo de timidina Etinil-desoxiuridina (EdU), se ve reducida a la mitad con respecto al control, tan pronto como 48 horas después del tratamiento, llegando a ser prácticamente nula a 72 horas de cultivo. Adicionalmente, se analizó el ciclo celular de forma bidimensional, combinando la incorporación de EdU con el intercalante de DNA yoduro de propidio. Como se puede ver en el diagrama de citometría de flujo (figura 6C) la drástica disminución de células en fase S ( $10\pm0.4\%$  en el control vs.  $3\pm1\%$  en el mutante), aparece acompañada de un acúmulo en fase G1 del ciclo celular ( $65\pm2\%$  y  $73\pm3\%$  en control y mutante respectivamente). De acuerdo con la reducida fracción de células replicativas, mediante conteo celular en días alternos se puede apreciar que el contenido celular en cultivos mutantes, apenas aumenta respecto del número inicialmente sembrado (figura 6D). Este ineficiente crecimiento celular no se debe a un defecto de supervivencia de las células mutantes, tal como indicaron los análisis de marcadores apoptóticos como Caspasa 3 activa (figura 6E, izquierda) o Anexina V (figura 6E, derecha). Así, al no encontrarse incremento en células positivas para estos marcadores, se concluyó que la falta de acumulación celular es debida exclusivamente a una disminución de la proliferación y no a un incremento en la muerte.

Para determinar los efectos deletéreos de la traslocación nuclear de la proteína Cre-ER, se cuantificó la proliferación de células que expresaban Cre-ER, tanto por incorporación de EdU (figura 7A, arriba) como por acumulación celular (figura 7A, abajo). Su comparación con MEFs de fenotipo silvestre o deficientes en RING1A (*Ring1A*<sup>-/-</sup>) reveló un efecto mínimo de la recombinasa sobre la proliferación celular. Asimismo la re-expresión de la proteína RING1B mediante transducción retroviral restauraba los niveles de incorporación (figura 7B) en comparación con la infección con un virus vacío como control. En conjunto, estos resultados confirman que el fenotipo de no acumulación en cultivo de fibroblastos deficientes en las proteínas RING1A y RING1B, se debe a una parada proliferativa, no a un aumento de la apoptosis, causada de forma directa por la delección de ambas proteínas.

## 1.2 El defecto de crecimiento en ausencia de proteínas RING1 se debe a un aumento de reguladores de ciclo celular

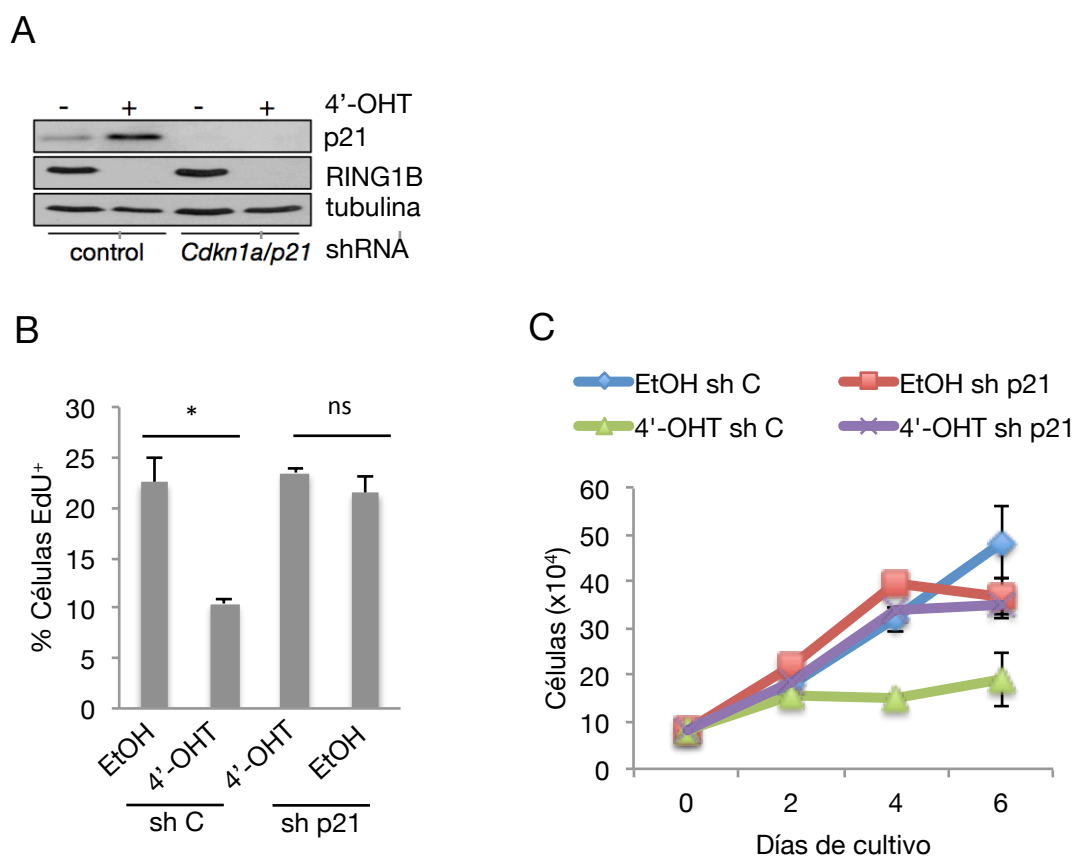
RING1A y RING1B son responsables de la represión del locus *Ink4a,b* que codifica la expresión de inhibidores de proliferación (inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas o CKis) entre los que se encuentra p16<sup>Ink4a</sup> (también conocido como CDKN2a) (Bracken et al. 2007; Calés et al. 2008; Maertens et al. 2009). Así pues, era de esperar que esta CKi se upregulara en el caso de la deficiencia de las proteínas RING1, tal y como se muestra en el WB de la figura 8A. No obstante, la conjunta deficiencia de *Ring1A*, *Ring1B* e *Ink4a,b* no restauraba los niveles de incorporación de EdU (figura 8B), sugiriendo así que la disminución



**Figura 8.** Inhibidores de ciclo celular en ausencia de proteínas RING1. (A) Upregulación de p16<sup>Ink4a</sup>/CDKN2a en MEFs tratados con 4'-OHT (mutante) en comparación con MEFs control (EtOH). (B) Incorporación de EdU en células portadoras de la versión silvestre (+/+) o mutante (-/-) del alelo *Ink4a,b* 48 horas después de la adición de EtOH/4'-OHT al cultivo. Los datos en el gráfico representan media y desviación estándar (n=3). \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.004$

de entrada en ciclo podría deberse a otro regulador. Mediante WB, detectamos en células mutantes upregulación de p21 (también conocido como CDKN1a), otra CKi previamente descrita como diana Polycomb (figura 9A) (Fasano et al. 2007; Román-Trufero et al. 2009). En contraste con lo reportado para las CKis codificadas por el locus *Ink4a,b*, la inactivación de *Cdkn1a/p21* mediante horquilla pequeña de RNA [small hairpin RNA (shRNA) por sus siglas en inglés] en células deficientes en RING1B, los niveles observados de incorporación de EdU, fueron similares a los cuantificados para las células control (figura 9B) indicando un rescate del fallo de entrada en fase S. Además, en un ensayo de acumulación celular a más largo plazo, se observó que en células mutantes, la inactivación concomitante de p21 permite,





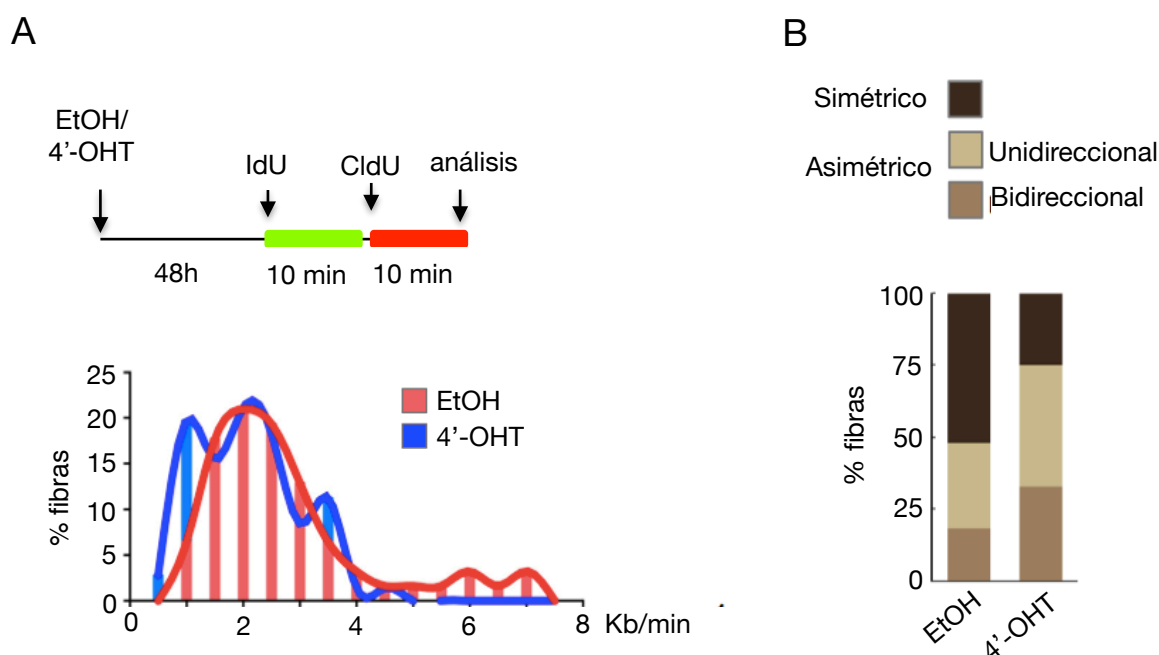
**Figura 9.** Defecto proliferativo debido a una upregulación de p21 en ausencia de las proteínas RING1. (A) WB mostrando los niveles de CDKN1a/p21 en MEFs control (EtOH) o mutantes (4'-OHT) transducidos con lentivirus que expresan un shRNA contra *Cdkn1a/p21* o un shRNA control. (B) Histograma que muestra el rescate de incorporación de EdU tras la inactivación de *Cdkn1a/p21*. Los valores representan media y desviación estándar (n=3). (C) Curva de proliferación celular de cultivos transducidos con los shRNA contra *Cdkn1a/p21* (sh p21) o control (sh C) siendo día 0 el día de la adición de EtOH/4'-OHT al cultivo. Los datos representan media y desviación (n=3). \*, p < 0.05; ns, no significativo (p ≥ 0.05)

transitoriamente, alcanzar un mayor número de células en el cultivo (figura 9C). Los resultados muestran que el déficit proliferativo observado en células deficientes en RING1A y RING1B se debe a un aumento del inhibidor de ciclo CDKN1a/p21, no a los productos del locus *Ink4a,b*

## 2. PROTEÍNAS RING1 Y REPLICACIÓN

### 2.1 Parada de horquillas de replicación y aparición de roturas de DNA en ausencia de RING1A y RING1B

En el diagrama de citometría mostrado en la figura 6C, se puede observar una distribución homogénea de células en fase S en el caso de las células control, mientras que en las células mutantes aparece una ligera tendencia de acumulo de células en la fase media de S. Con el fin de investigar un posible efecto de la deficiencia de proteínas RING1 asociado a la fase S, se analizó de forma directa la replicación en células control y mutantes a nivel molecular. Para ello, las células fueron pulsadas con los análogos de timidina Yodo-

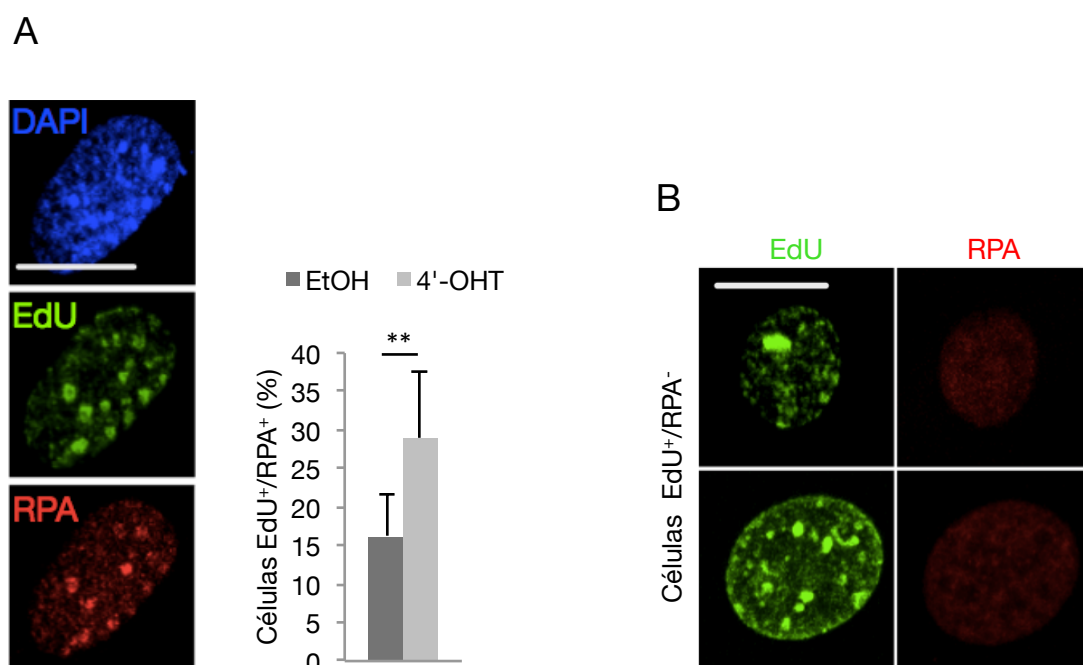


**Figura 10.** Defecto replicativo en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Esquema del diseño experimental de los pulsos con análogos de timidina usados en los análisis de fibras de DNA. (B) Distribución de las velocidades de elongación de replicación de las fibras analizadas en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante). Los datos muestran el análisis de al menos 150 fibras en cada condición (n=3). (C) Gráfico de barras mostrando el análisis de la asimetría detectada en las fibras de DNA en células control o mutantes. Al menos 80 fibras fueron analizadas de cada condición por experimento (n=2).

desoxiuridina y Cloro-desoxiuridina (IdU y CldU respectivamente) como se indica en el esquema experimental de la figura 10A, arriba. El estudio de los patrones de fluorescencia de las fibras de DNA, permite determinar las velocidades de elongación en el conjunto de horquillas analizadas (ver métodos). Los resultados mostraron que la distribución de

velocidades difería entre cultivos control y mutantes, de modo que la frecuencia de horquillas con una dinámica de replicación más lenta era mayor en células deficientes en RING1A y RING1B, haciendo que la media total de progresión de horquillas de replicación fuera menor (figura 10A, abajo).

Una velocidad reducida de horquillas, puede estar relacionada con un aumento de paradas replicativas como consecuencia de barreras naturales en el genoma o desacoplamiento entre la helicasa y la polimerasa (Byun et al. 2005; Walter and Newport 2000). Con el fin de estudiar si la reducción en la velocidad observada era consecuencia de un aumento de parada de horquillas, realizamos medidas de los segmentos de incorporación

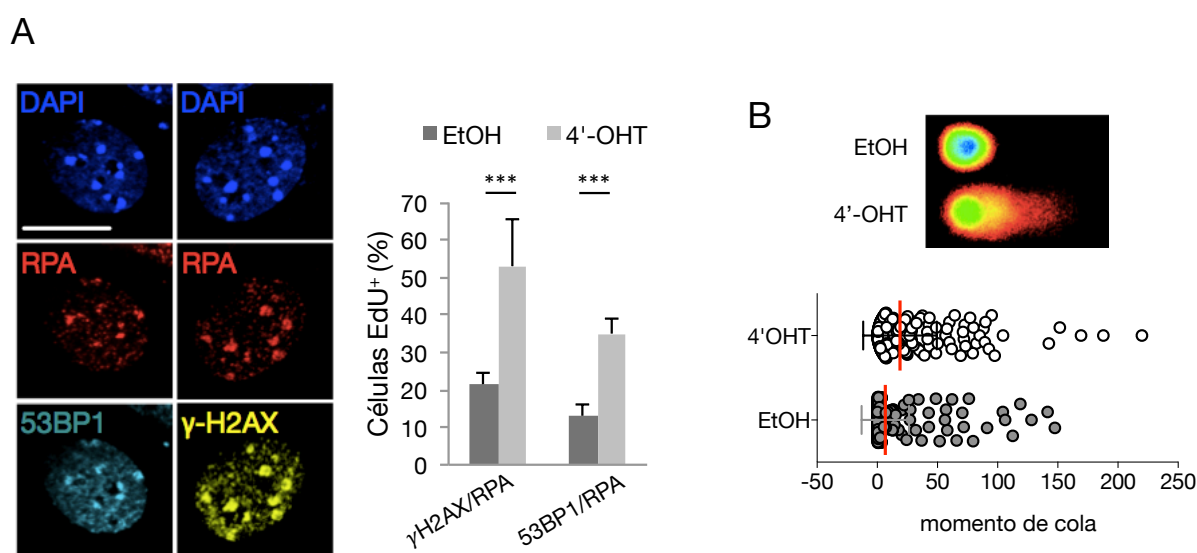


**Figura 11.** Aparición de estrés replicativo en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Análisis mediante inmunofluorescencia del estrés replicativo en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante). Se muestra la existencia de un enriquecimiento de la proteína RPA insoluble en ausencia de RING1B en células EdU positivas. Los datos en el gráfico representan media y desviación estándar de al menos 100 células por experimento (n=4). (B) Ejemplo de células replicativas sin signos de estrés replicativo (RPA negativas). \*\*, p = 0.01. Escala 10  $\mu$ m.

de nucleótidos a partir de los orígenes de replicación generando tres categorías de simetría: orígenes simétricos, cuando se observaba incorporación en ambas direcciones desde el mismo; orígenes asimétricos unidireccionales, si solo existía incorporación hacia una dirección, y orígenes asimétricos bidireccionales cuando la incorporación fallaba en ambas direcciones. La cuantificación de estos tipos de simetría reveló que en la situación mutante, la fracción de orígenes asimétricos tanto uni- como bidireccionales estaba incrementada en

relación con las células control, resultado consistente con una mayor incidencia de parada de horquillas en células deficientes en RING1A y RING1B (figura 10B).

En situaciones de estrés replicativo, el desacoplamiento de la helicasa y la polimerasa deja al descubierto largos fragmentos de DNA de cadena sencilla. Este DNA debe ser recubierto por la proteína de replicación RPA32 (en adelante, RPA) protegiéndolo así del ataque de nucleasas que darían lugar a roturas en el DNA (Zou and Elledge 2003). Para determinar si las células mutantes presentaban mayor nivel de estrés replicativo en condiciones basales, sin añadir una fuente de estrés externa al cultivo, se analizó la fracción insoluble asociada a replicación de RPA en células positivas para EdU. El análisis de las



**Figura 12.** Incremento de roturas en el DNA en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Fracción de células replicativas doblemente positivas para RPA/γH2AX y RPA/53BP1 en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante). (B) Roturas de DNA detectadas mediante ensayo alcalino de cometas; izquierda: diagrama de distribución de puntos representando los valores de momento de cola de al menos 150 células por condición en cada experimento (n=4). La línea roja en el diagrama representa la media y la desviación estándar; derecha: imágenes de células representativas de cada condición teñidas con SYBR green tras la electroforesis de célula única en condiciones alcalinas. \*\*\*,  $p \leq 0.004$ . Escala 10  $\mu\text{m}$ .

fluorescencias específicas para cada uno de los marcajes determinó, que en condiciones mutantes la fracción de células doble positivas EdU/RPA presentaba un incremento del doble con respecto al nivel basal de estrés observado en las células control (figura 11A). Como se puede ver en las imágenes de la figura 11A, en las células que presentan estrés replicativo, la proteína RPA adquiere un patrón que coincide con zonas de incorporación de nucleótidos en focos discretos, en comparación con un patrón débil pan nuclear (distribución homogénea en

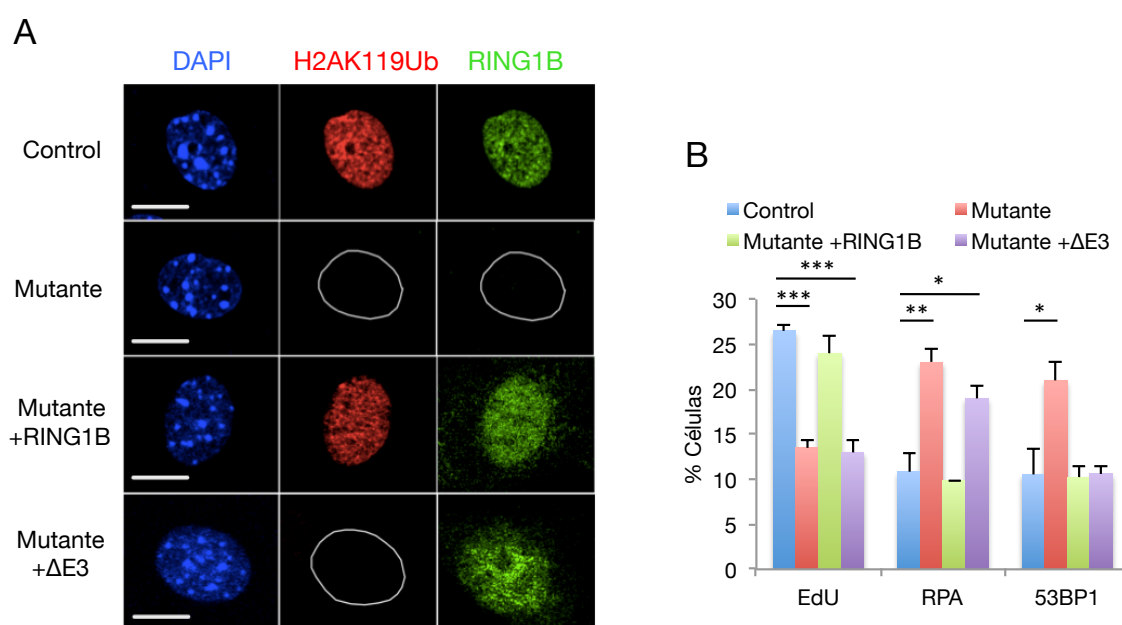
el núcleo) en las células que no sufren estrés (figura 11B). Analizando marcadores de roturas de DNA como la fosforilación de H2AX ( $\gamma$ H2AX) y 53BP1 (Balajee and Geard 2004; B. Wang et al. 2002) se observó que ambos aparecían enriquecidos en células replicativas deficientes en RING1A y RING1B, presentando una gran colocalización entre ellos (figura 12A). Para confirmar la existencia de daño en el DNA se realizó un ensayo alcalino de cometas. Esta aproximación se basa en la electroforesis de células individuales incluidas en un microgel de agarosa. De esta manera, si el DNA cargado positivamente presenta roturas, los extremos se desenrollarán y migrarán durante la electroforesis. Su combinación con técnicas de microscopía de fluorescencia gracias a la adición del intercalante de DNA SYBR green, permite la visualización del DNA migrado como una cola tras la célula, recordando a un cometa. Así pues, al someter a nuestras células a un ensayo de cometas en condiciones alcalinas, que permite detectar tanto las roturas de doble cadena como las de cadena sencilla típicas de estrés replicativo, aparece un momento de cola de cometa significativamente mayor en las células mutantes que en las células control (figura 12B). Estos resultados en conjunto, aportan evidencia clara de que en ausencia de ambas proteínas RING1 y sin una perturbación externa, las células presentan un estrés replicativo más elevado que el basal en estas células y una concomitante aparición de roturas, probablemente como consecuencia de la aparición de estrés previo.

## **2.2 La actividad E3 ligasa de RING1B está relacionada con la aparición de estrés replicativo**

Para RING1A y RING1B se han descrito funciones tanto dependientes como independientes de su actividad E3 ubiquitín ligasa (Eskeland et al. 2010; Isono et al. 2013), por lo que nos preguntamos si la aparición de estrés replicativo y sus roturas asociadas, tenía relación con la capacidad de ubiquitinación de RING1B. Para su investigación, utilizamos una variante proteica del mismo, en el que mediante la mutación IL53,55AA quedaba eliminada su actividad ubiquitín ligasa ( $\Delta$ E3) (Buchwald et al. 2006; Endoh et al. 2012). Con el fin de confirmar la falta de actividad de ubiquitinación de este mutante, se introdujo en MEFs a través de transducción retroviral. Mediante tinciones de inmunofluorescencia se determinó que, mientras en células deficientes en RING1A y RING1B transducidas con la

versión silvestre de RING1B se recuperaba el nivel de H2AK119Ub, no ocurría así en células transducidas con el mutante  $\Delta E3$  de RING1B (figura 13A).

Para estudiar el efecto que este mutante de ubiquitinación tenía sobre el estrés replicativo y roturas previamente descritos en ausencia de RING1A y RING1B, se analizaron las células complementadas con el mutante  $\Delta E3$  por inmunofluorescencia. El resultado reveló que en células transducidas con la versión silvestre de RING1B, tanto el nivel de estrés



**Figura 13.** El estrés replicativo en ausencia de RING1A y RING1B es dependiente de su actividad E3 ligasa. (A) Imágenes de células representativas de cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante); estos cultivos fueron transducidos con retrovirus que expresan la forma silvestre de RING1B (mutante +RING1B) o la forma E3 mutada (mutante + $\Delta E3$ ); la proteína RING1B endógena (en células control) y la ectópica fueron detectadas con anticuerpos anti-RING1B o anti-FLAG respectivamente. En los casos de señal de inmunofluorescencia negativa los núcleos fueron delimitados usando el canal correspondiente al DAPI para esa misma célula. (B) Gráfico de barras indicando tasa proliferativa (incorporación de EdU), estrés replicativo (RPA) y roturas de DNA (53BP1) en los cultivos indicados. Los valores representan porcentajes de células totales en el cultivo en el caso de la incorporación de EdU y fracción de células replicativas (EdU<sup>+</sup>) en el caso de la señalización de daño (RPA y 53BP1). Los datos en el gráfico representan media y desviación estándar (n=3). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.007$ . Escala, 10  $\mu$ m

replicativo (cuantificado como células EdU<sup>+</sup>/RPA<sup>+</sup>) como sus roturas asociadas (EdU<sup>+</sup>/53BP1<sup>+</sup>) se veía restaurado al nivel presente en las células control (figura 13B). Por el contrario, al hacer el mismo análisis en células transducidas con la versión  $\Delta E3$  de RING1B, se observó que aunque el número de células 53BP1 disminuía, no ocurría así con las células RPA positivas. De esta manera, mediante ensayos de complementación en fibroblastos embrionarios con esta forma E3 mutada de RING1B, podemos inferir una función dual, por

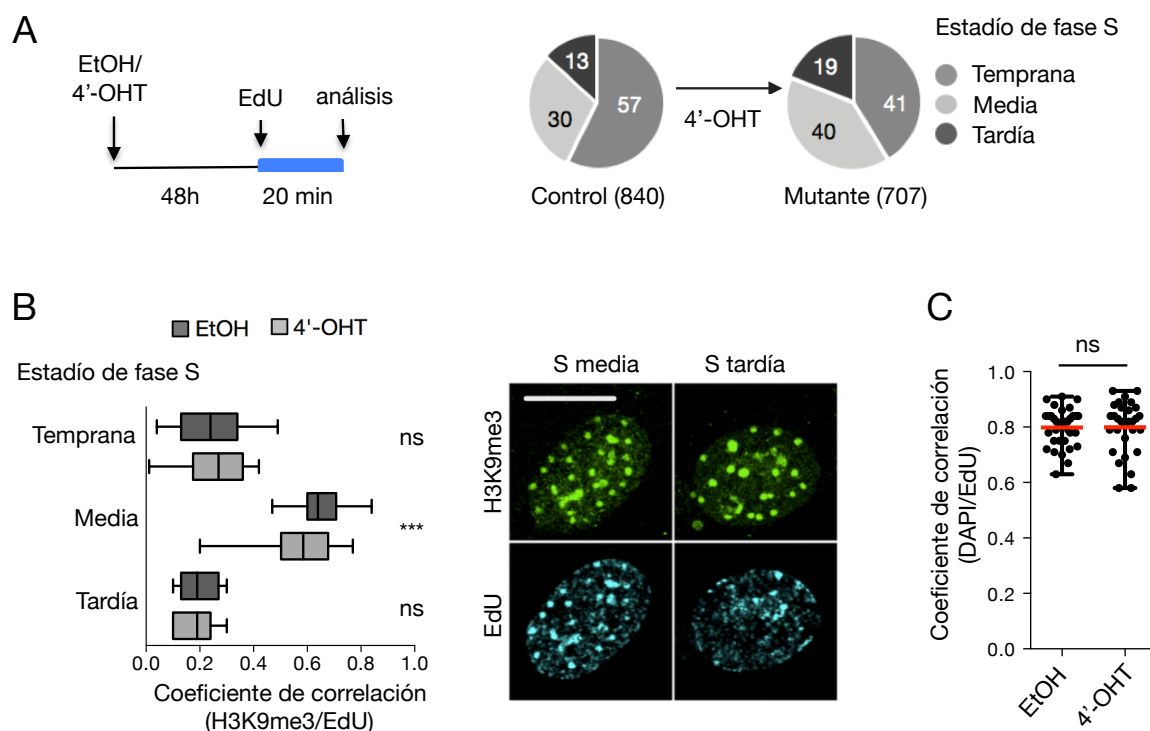
la cual la ubiquitinación mediada por RING1B sería necesaria para reducir o mantener el estrés replicativo a nivel basal, mientras que su presencia, aun en forma inactiva, sería suficiente para evitar la generación de roturas.

### **2.3 Defecto de replicación de cromatina pericentromérica en ausencia de RING1**

Basándonos en los datos antes expuestos, nos preguntamos si los defectos observados en replicación aparecían relacionados con un momento concreto dentro de la fase S. Esta determinación se llevó a cabo gracias a los patrones citológicamente definidos espacio-temporalmente que determinan tres estadios de fase S: una fase temprana donde tiene lugar la replicación mayoritaria de eucromatina, o cromatina activa, y unas fases media y tardía donde se replica el resto de la cromatina, en su mayor parte heterocromatina (Quivy et al. 2008; R. Wu, Singh, and Gilbert 2006). Mediante un pulso de 20 min con EdU en cultivos asíncronos 48 horas después de su tratamiento con EtOH/4'-OHT (figura 14A, izquierda), se cuantificaron los patrones de fase S presentes en las células. Como se puede ver en la figura 14A, derecha aparecieron doblemente representados en las células mutantes aquellos patrones correspondientes a las fases media y tardía de la fase S.

Los fibroblastos embrionarios de ratón replican la heterocromatina pericentromérica (PCH, pericentric heterochromatin) durante el estadio medio de fase S (Guenatri et al. 2004). Para descartar que una desestructuración global de la cromatina subyaciera al efecto observado de acumulación celular en fase media de S, se estudió la localización de histona H3 tri-metilada en la lisina 9 (H3K9me3). Esta marca, característica de regiones heterocromáticas (Guenatri et al. 2004), se analizó en células replicativas identificadas por la incorporación de EdU (pulso de 30 minutos). Al hacer un análisis digital de ambas fluorescencias se observó que, de acuerdo con lo anteriormente publicado, existe una colocalización significativa (coeficiente de correlación de Pearson  $> 0.5$ ) solamente en aquellas células replicando en fase media de la fase S (Guenatri et al. 2004), y no en las que se encuentran en fase temprana o tardía de la replicación, siendo así tanto en células control como mutantes (figura 14B). En línea con los resultados anteriores, la colocalización en el caso de las células mutantes de H3K9me3 y EdU, aparece significativamente menor que en las células control, lo que lleva de nuevo a pensar en una replicación disminuida en

heterocromatina en el caso de células deficientes en RING1A y RING1B (figura 14B). En células de ratón, los centrómeros aparecen agrupados en 5-10 cromocentros fácilmente distinguibles en núcleos interfásicos mediante la tinción con DAPI. Teniendo en cuenta que el coeficiente de correlación de Pearson de H3K9me3 y zonas densas de DAPI (figura 14C) no



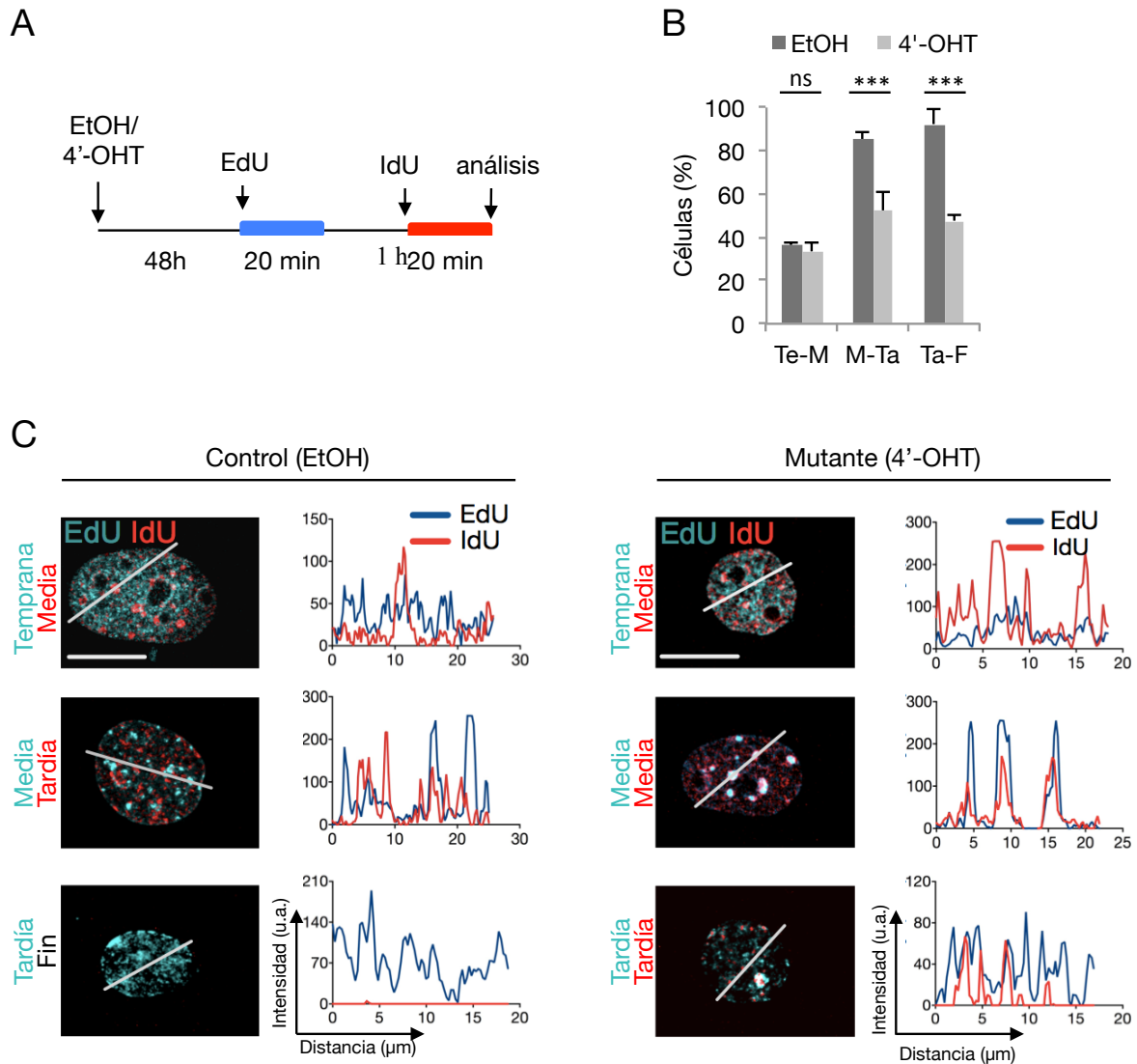
**Figura 14.** La ausencia de proteínas RING1 provoca un defecto de progresión en fase S. (A) Izquierda: esquema del diseño experimental para el análisis de la fase S; derecha: gráfico de sectores indicando la distribución de fases replicativas presentes en las condiciones control (EtOH) y mutante (4'-OHT) tras el pulso indicado con el análogo de timidina EdU. Las células fueron contadas en campos aleatorios hasta que al menos se contabilizaron 50 células de la fase más infrecuente (la fase tardía). El número total de células contadas aparece entre paréntesis (n=4). (B) Izquierda: diagrama de cajas mostrando la distribución de valores de coeficiente de correlación de Pearson entre el análogo de timidina EdU y H3K9me3 de al menos 30 células por fase en cada experimento (n=2); derecha: imágenes representativas que ilustran la distinta colocalización del análogo de timidina y la cromatina pericentromérica (H3K9me3) en función del estadio de fase S en la que se encuentren. (C) Diagrama de distribución de puntos mostrando los coeficientes de correlación de Pearson entre H3K9me3 y DAPI de al menos 50 células de cada condición. La línea roja en el diagrama representa la media y desviación estándar. \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; ns, no significativo ( $p \geq 0.05$ ). Escala 10  $\mu$ m.

aparecía disminuido en las células mutantes, se puede descartar que los resultados obtenidos sean consecuencia de un brusco cambio en la estructura de la heterocromatina. Estos datos apuntan a una función de las proteínas RING1A y RING1B en asegurar una correcta replicación de zonas heterocromáticas pericentroméricas.

Posteriormente se estudió la progresión en fase S de una forma más dinámica mediante un ensayo cinético de pulso y caza. Como se indica en la figura 15A con un esquema del



diseño experimental, se realiza un pulso corto de EdU (20 min) y una caza de una hora, tras la que se realiza otro pulso con el segundo nucleótido (IdU) de otros 20 min. De esta manera se puede cuantificar la aparición de tres patrones de tinción doble dependiendo del momento de



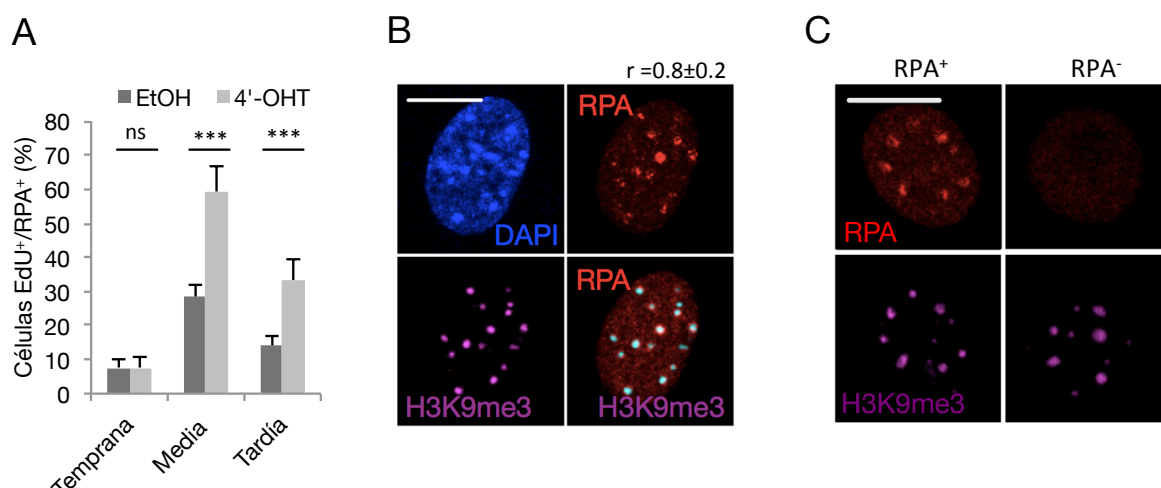
**Figura 15.** Fallo de replicación en heterocromatina en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Esquema del diseño experimental para la aproximación de pulso y caza con análogos de timidina. (B) Gráfico de barras mostrando los porcentajes de transición presentes en MEFs tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante) siendo Te-M, transición de fase temprana a media de la fase S; M-Ta: de media a tardía y Ta-F de la fase tardía a fin de la replicación. Los datos representan media y desviación estándar de al menos 50 transiciones de cada tipo en cada experimento (n=4). (C) Derecha: imágenes representativas de las tinciones de EdU/IdU para determinar los patrones de transición; izquierda: imágenes representativas de células mutantes ilustrando el fallo de transición en la fase S. A la derecha de cada imagen se muestran los histogramas de intensidad de fluorescencia de ambos análogos de timidina a través del segmento nuclear señalado en cada imagen. \*\*\*,  $p \leq 0.001$  Escala 10  $\mu\text{m}$ .

fase S en el que se encuentren en el tiempo que dura cada pulso: patrón uno, células transitando de S temprana a media; patrón dos, de media a tardía; y patrón tres, células que

terminan la fase tardía tras el primer pulso (figura 15C, izquierda). En la figura 15C se muestran imágenes representativas de cada condición: en la condición control, la situación más frecuente es que las células hayan transitado de fase en lo que dura la caza experimental (figura 15C, izquierda), mientras que en la condición mutante la situación más frecuente es que las células continúen en la misma fase tras el tiempo de caza (figura 15C, derecha). Mediante un análisis de colocación digital a través de un segmento de célula, se confirma esta situación: las células control replican zonas distintas del núcleo durante los distintos pulsos (histogramas en figura 15C izquierda), mientras que las células mutantes continúan incorporando en la misma zona de DNA durante el primer y segundo pulso (histogramas en figura 15C derecha). En la figura 15B, se representan el porcentaje de células que estando en una fase determinada durante el primer pulso, han transitado a la siguiente durante el segundo pulso, frente a una situación en la que la célula incorpora con el mismo patrón de fase en ambos pulsos. Por medio de la cuantificación de los tres patrones de transición descritos, se observó que la frecuencia de los patrones dos y tres (células que terminan la fase media o la tardía durante el tiempo de caza entre los dos pulsos) están significativamente reducidos en las condiciones mutantes lo que sugiere una replicación más lenta durante ambas fases (figura 15B).

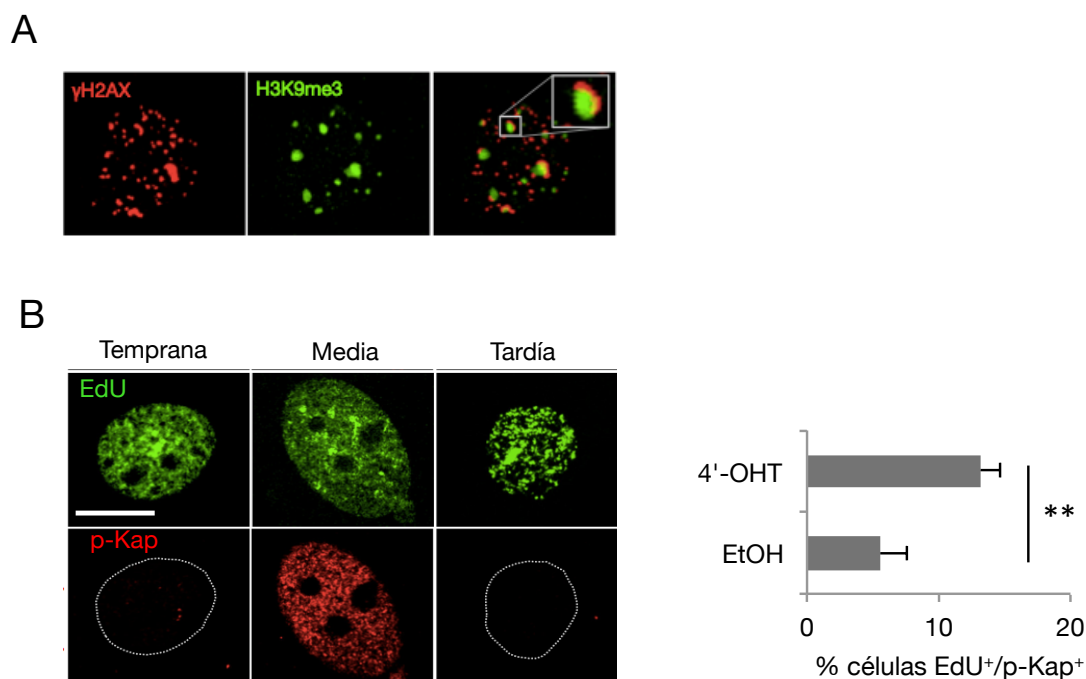
## 2.4 La ausencia de proteínas RING1 provoca la aparición de roturas en heterocromatina derivadas de estrés replicativo

A la vista de los resultados, anteriormente expuestos, nos preguntamos si la aparición de estrés replicativo aparecía concentrado en estas fases donde la dinámica de transición era más lenta. Para ello se analizó la fracción asociada a cromatina de RPA en cada una de las fases de



**Figura 16.** Aparición de estrés replicativo y roturas en heterocromatina en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Fracción de RPA insoluble asociada a las distintas fases replicativas en MEFs tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante). (B) Imágenes representativas de células en estadio medio de fase de S presentando estrés replicativo asociado a cromocentros. El número sobre la foto corresponde a la media y desviación estándar del coeficiente de correlación de Pearson entre H3K9me3 y RPA de al menos 50 células H3K9me<sup>+</sup>/RPA<sup>+</sup> en cada experimento (n=2). (C) Imágenes representativas de células H3K9me<sup>+</sup>/RPA<sup>+</sup> y H3K9me<sup>3</sup>/RPA<sup>-</sup> para ilustrar la comparación entre ellas. \*\*\*,  $p \leq 0.006$ ; ns, no significativo ( $p \geq 0.05$ ). Escala, 10  $\mu$ m.

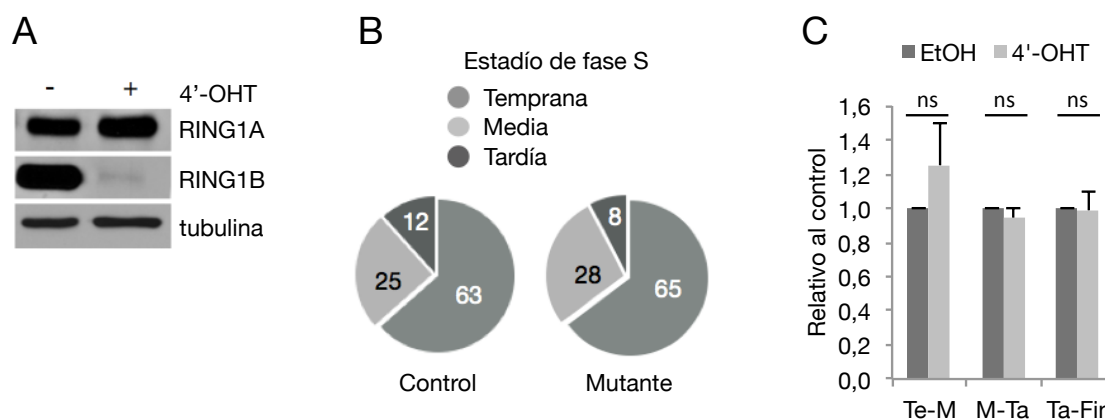
la fase S mediante inmunofluorescencia. Como se puede apreciar en la gráfica de la figura 16A, los estadios de fase S que más estrés replicativo presentan son aquellos en los que se replica la heterocromatina, la fase media y la fase tardía. Al analizar el patrón de fluorescencia de RPA en relación con la modificación histónica propia de la heterocromatina H3K9me3, se puede observar a simple vista que el RPA insoluble aparece concentrado en cromocentros (visualizados mediante H3K9me3 y DAPI, figura 16B). Al hacer un análisis digital de ambas marcas se obtiene un coeficiente de correlación de Pearson mayor de 0.5, confirmando la colocalización existente entre ellas (número sobre las imágenes en figura 16B). A modo de ilustración de la validez del sistema, en la figura 16C se muestran imágenes representativas de células que presentan estrés asociado a cromocentros en comparación con células sin estrés.



**Figura 17.** Aumento de reparación de heterocromatina en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Imágenes ilustrativas del marcaje de  $\gamma$ H2AX en la periferia de los cromocentros indicando la extrusión de la zona heterocromática dañada para su reparación en células mutantes. (B) Izquierda: imágenes de la tinción de la proteína p-Kap ilustrando su presencia únicamente en fase media de S; derecha, cuantificación de p-Kap en células replicativas de cultivos control (EtOH) y mutantes (4'-OHT). El gráfico muestra media y desviación estándar de al menos 100 células por experimento (n=2). \*\*,  $p \leq 0.01$ . Escala 10  $\mu$ m

El aumento de roturas y estrés detectados en heterocromatina podría deberse a un fallo en su reparación ya que estas zonas de cromatina están asociadas a una baja eficiencia del proceso debido a su estado hipercondensado. En primer lugar pudimos apreciar que, incluso con la limitada resolución que permite la microscopía óptica, la concentración de  $\gamma$ H2AX en células mutantes aparece en regiones periféricas de los cromocentros (figura 17A). Esta alteración estructural es necesaria para una eficiente reparación de heterocromatina y es debida, al menos en parte, a la liberación del remodelador de cromatina CHD3, normalmente unido a la proteína KAP1 en heterocromatina. La presencia de estas dos proteínas incrementa la compactación de la zona. Como parte de la respuesta de daño a DNA, la fosforilación de KAP1 en S824 (p-Kap) por la kinasa ATM, induce la liberación de CHD3, permitiendo la relajación y reparación de la rotura (Klement et al. 2014). De acuerdo con la relocalización de  $\gamma$ H2AX a la periferia de cromocentros en células deficientes en RING1A y RING1B, observamos un aumento de células p-KAP1 positivas (figura 17B) mostrando un patrón pan-nuclear (homogéneo en el núcleo) restringido exclusivamente a células replicando la fase

media de la fase S (Price and D'Andrea 2013; Ziv et al. 2006). Así pues, los datos apuntan a un aumento de reparación de heterocromatina en las células mutantes, mecanismo que no se ve afectado por la deficiencia de RING1A y RING1B.



**Figura 18.** Progresión en fase S de MEFs que expresan RING1A. (A) Análisis mediante WB a 48 horas de tratamiento con 4'-OHT, de las proteínas RING1A y RING1B en extractos celulares totales mostrando la ausencia prácticamente total de RING1B mientras se expresa RING1A. Extractos analizados con anti-RING1A, anti-RING1B y anti  $\alpha$ -tubulina como control de carga (B) Los valores en el gráfico representan los patrones de transición relativos a las células control (Te-M, de fase temprana a media; M-Ta, de media a tardía y Ta-Fin, de tardía a completar la fase S) en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante). (C) Gráfico de sectores mostrando la fracción de células presentes a 48 horas en los cultivos indicados tras un pulso del análogo de timidina EdU. Los datos representan media y desviación estándar (n=2). ns, no significativo ( $p \geq 0.05$ )

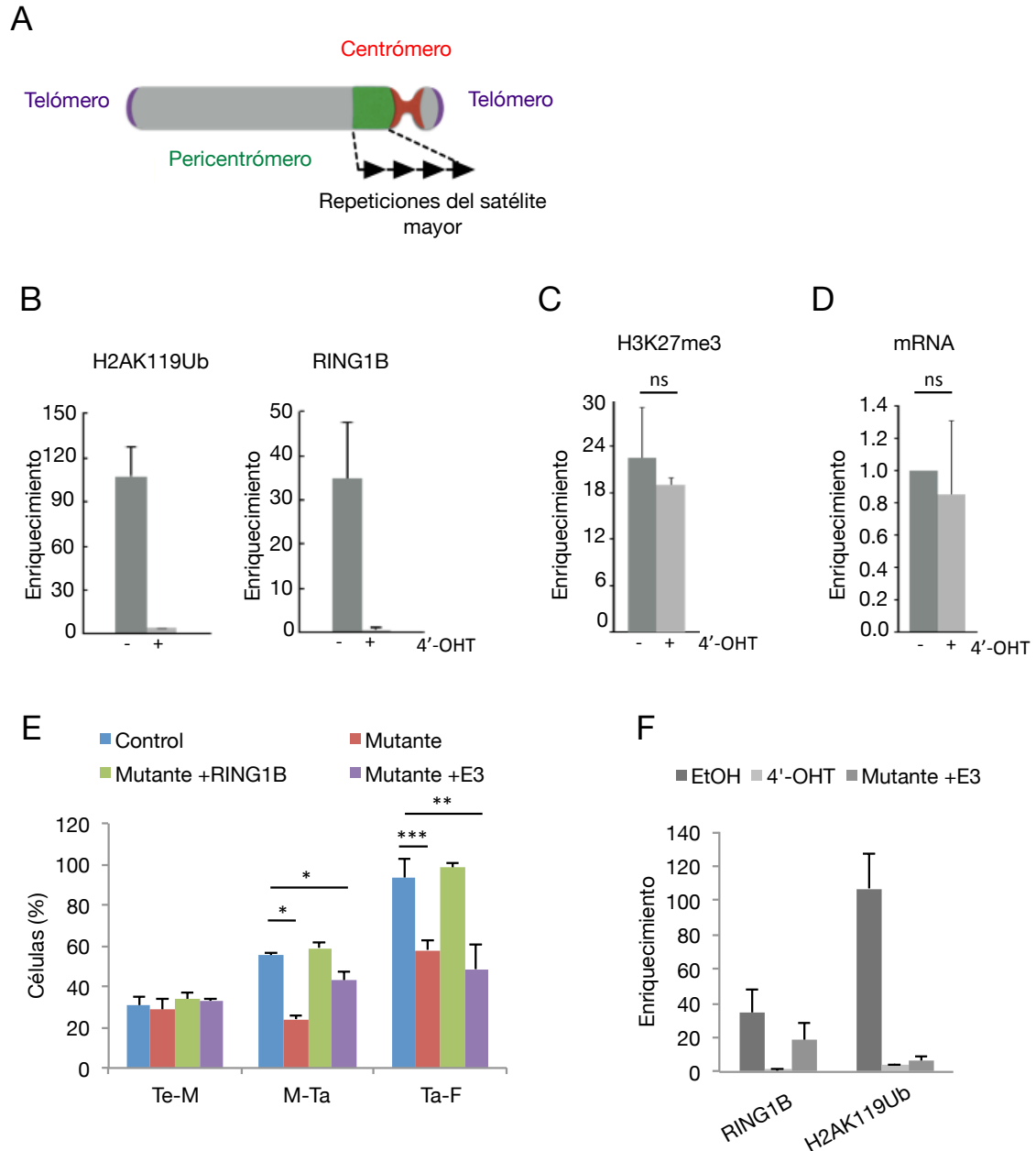
Con el fin de estudiar si la sola expresión de RING1A fuera suficiente para evitar los defectos replicativos observados, usamos fibroblastos embrionarios derivados de la línea murina *Ring1B<sup>fl</sup>*, *Polr2a:Cre-ERT2* en la que siendo normal la expresión de RING1A, se inactiva la de RING1B mediante la adición de 4'-OHT al cultivo. De esta manera, tras un tratamiento de 48 horas con 4'-OHT, se puede observar mediante WB la presencia de RING1A, mientras que RING1B se encuentra prácticamente ausente (figura 18A). Analizando la distribución de fases dentro de la fase S, observamos que en presencia de RING1A los porcentajes eran muy similares a los observados para las células control (figura 18B). En línea con este resultado, al cuantificar los porcentajes de transición de la forma anteriormente descrita en la figura 15 se recupera una dinámica replicativa similar a la de las células control (figura 18C). Con estos datos, se puede concluir que ambos parálogos presentan una equivalencia funcional para los parámetros replicativos analizados en nuestro sistema de estudio.

## **2.5 Progresión a través de la fase S dependiente de la actividad E3 ligasa de RING1B**

Para determinar si los defectos observados en la replicación a través de las zonas heterocromáticas estaba relacionado con la presencia o no de ubiquitina, se estudió la secuencia correspondiente a los satélites mayores de los cromosomas de ratón. Estas regiones, que replican en fase media de S, constan de secuencias repetitivas de 234 pares de bases y representan gran parte de la cromatina pericentromérica (Guenatri et al. 2004). Mediante inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, chromatin immunoprecipitation) se vio que, como se muestra en la figura 19B, izquierda, en células control existía un enriquecimiento en H2AK119Ub en estos dominios, mientras que aparecía ausente en las células doble mutantes tan pronto como 48 horas después del tratamiento con 4'-OHT. Este resultado está de acuerdo con el alto recambio descrito para esta modificación de cromatina (Alchanati et al. 2009). Así mismo se detectó la presencia de RING1B en estas regiones en el caso de células control (figura 19B, derecha). Para determinar si la falta de ubiquitinación mediada por RING1B tenía un efecto sobre la modificación de cromatina llevada a cabo por PRC2, se analizó la presencia de trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3). Sin embargo, como se aprecia en el gráfico de la figura 19C, la ausencia de RING1B y ubiquitina en los satélites mayores no parece tener efecto sobre la H3K27me3, modificación dependiente de PRC2.

Habiendo sido descrita la relación de la ubiquitinación de H2A con la represión génica, nos preguntamos si la ausencia de ubiquitina podría estar teniendo un efecto de activación transcripcional en estas zonas. Para ello, analizamos mediante PCR reversa la expresión de los satélites mayores, para así poder descartar si la aparición de daño en estas zonas se debía a colisiones entre las maquinarias de replicación y transcripción (Helmrich et al. 2013). El análisis de mensajero de los satélites no reveló diferencias de expresión entre las células control y mutantes (figura 19D), quedando así excluida la interferencia entre ambas rutas metabólicas como fuente del estrés replicativo observado.

De nuevo, como en el caso de la aparición de estrés en las células deficientes en RING1A y RING1B, nos preguntamos si la capacidad de RING1B para ubiquitinar estaba



**Figura 19.** El retraso en fase S coincide con una pérdida de H2AK119Ub en heterocromatina pericentromérica. (A) Esquema del típico cromosoma acrocéntrico de ratón indicando los dominios heterocromáticos y la situación de los satélites mayores en la zona pericentromérica. (B, C, F) Análisis de marcas de cromatina mediadas por Polycomb (H2AK119Ub y H3K27me3) y unión de RING1B a satélites mayores analizados por ChIP-qPCR. Los valores representan media y desviación estándar (n=3). (D) Análisis de transcritos de satélite mayor cuantificados por RT-qPCR. Los valores representan enriquecimiento frente a las células control. (E) Gráfico de barras mostrando los porcentajes de transición presentes en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante) o transducidos con las versiones silvestre y (mutante +RING1B) y E3 de RING1B (mutante +E3). Te-M, transición de fase temprana a media de la fase S; M-Ta: de media a tardía y Ta-F de la fase tardía a fin de la replicación. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.007$

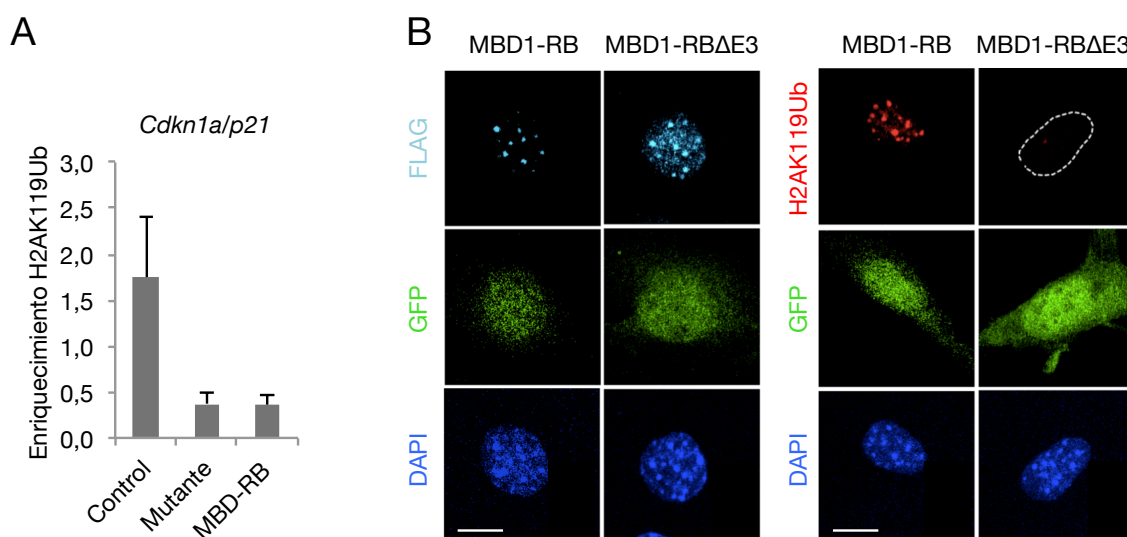
implicada en el fallo de replicación de heterocromatina pericentromérica. Para contestar a esta pregunta, se realizó el mismo ensayo de pulso y caza en células control y mutantes transducidas con los retrovirus control, y portadores de las versiones  $\Delta E3$  y silvestre de RING1B. Analizando los datos obtenidos siguiendo los criterios anteriormente descritos (figura 15), se puede observar que, mientras las células transducidas con la versión silvestre de RING1B recuperan los niveles de transición descritos para las células control, no ocurre así con las células que expresan la versión  $\Delta E3$  mutada, cuyos porcentajes de transición continúan siendo similares a los observados en las células mutantes (figura 19E). Mediante el análisis por ChIP de la H2AK119Ub en las secuencias satélites de células que expresan el mutante  $\Delta E3$ , confirmamos la ausencia de ubiquitina reportada en la figura 13A mediante inmunofluorescencia. Sin embargo, la presencia de RING1B en satélites no parece verse afectada por la mutación (figura 19F).

Con estos resultados se puede concluir que en ausencia de RING1B, y por tanto de H2AK119Ub, la replicación de heterocromatina pericentromérica se encuentra ralentizada, lo que produce un aumento del estrés replicativo en estas zonas, y que este efecto es dependiente de la capacidad de ubiquitinación de RING1B.





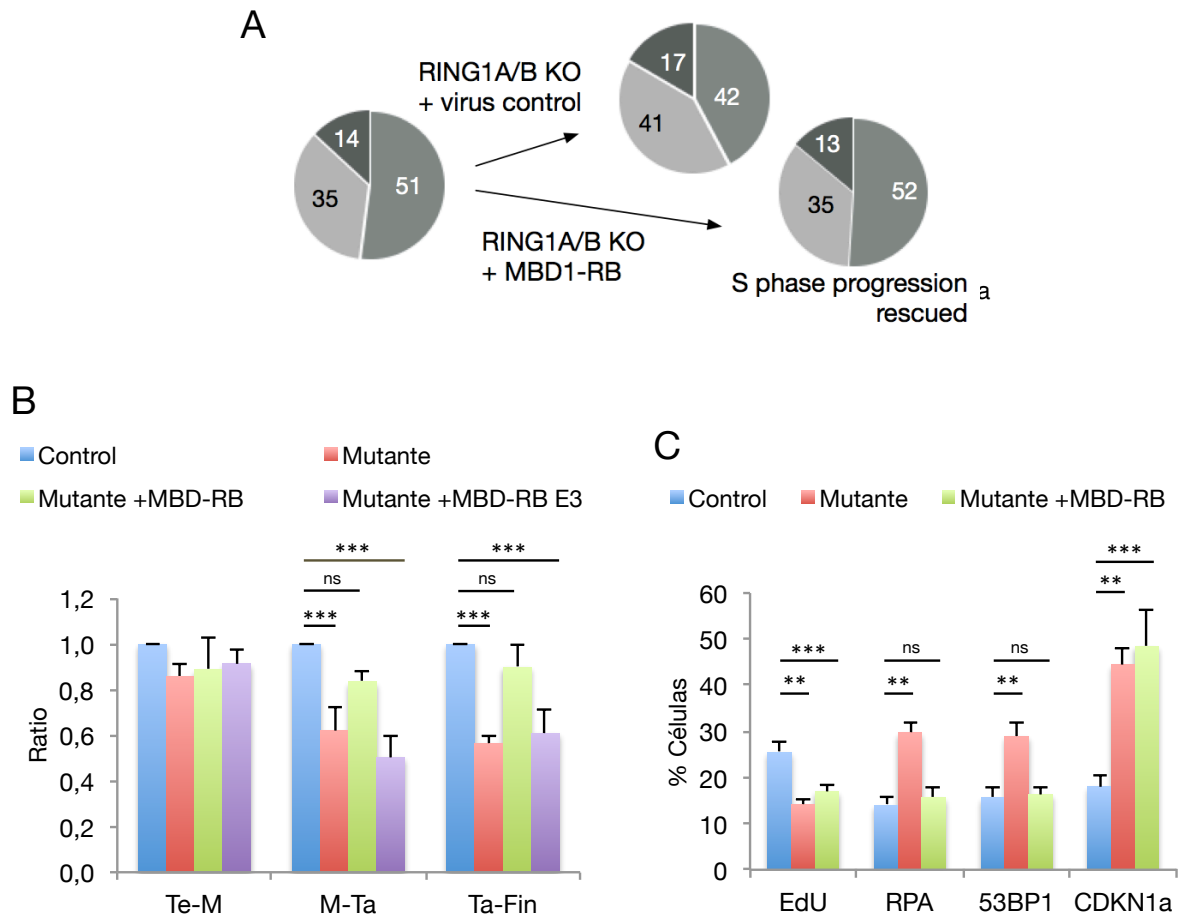
(metil-CpG) de la proteína MBD1 se consiguió dirigir la ubiquitinación exclusivamente a la región pericentromérica (Cooper et al. 2014) (figura 20A). Como se puede ver en las imágenes de la figura 20B, la expresión de la proteína de fusión resulta en un enriquecimiento de la señal de fluorescencia de H2AK119Ub en cromocentros de células control (visualizados con DAPI), mientras que en las células tratadas con 4'-OHT, esta ubiquitinación queda exclusivamente restringida a los mismos, mostrando así la especificidad del módulo de ubiquitinación dirigido. Asimismo, mediante inmunoprecipitación de cromatina se vio que la ubiquitinación en zonas regulatorias del locus *p21/Cdkn1a* se perdía tras la adición del 4'-OHT. El hecho de que con la expresión de la proteína de fusión, esta ubiquitina no se vea



**Figura 21.** Especificidad del módulo dirigido de ubiquitinación. (A) Análisis mediante ChIP-qPCR del enriquecimiento de H2AK119Ub en las secuencias reguladoras de *p21/Cdkn1a*, en células tratadas con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante), siendo MBD-RB células deficientes en RING1A y RING1B que expresan la proteína de fusión MBD1-RB. El gráfico muestra medias de enriquecimiento y desviación estándar (n=2) (B) Capacidad de ubiquitinación de las proteínas de fusión MBD1. Imágenes representativas de células que expresan proteínas de fusión MBD1 (izquierda) y su distinta capacidad de ubiquitinación de H2A (derecha). GFP y FLAG son indicativos de células transducidas y expresión respectivamente, de la proteína de fusión indicada en cada caso. MBD1ΔE3: proteína de fusión para ubiquitinación dirigida a PCH sin actividad E3 ligasa. En caso de señal de fluorescencia negativa, los núcleos han sido delimitados en blanco usando el canal correspondiente al DAPI para esa misma célula. Escala 10 μm

recuperada (figura 21A), apoya la especificidad de modificación dirigida a PCH. Para comprobar si la H2AK119Ub detectada en PCH era estrictamente debida a la capacidad de nuestro módulo mínimo de ubiquitinación para interaccionar con la E2 ligasa, utilizamos una fusión MBD1-RB portadora de mutaciones que inactivan dicha interacción con la E2 ligasa (I53A y C51G en los dedos RING de RING1B y BMI1, respectivamente), MBD1-RBΔE3.

Así, como ilustran las fotografías de la figura 21B, al observar el patrón de distribución de H2AK119Ub mediante inmunofluorescencia en células que expresaban dicha proteína de fusión, no se detectaba H2AK119Ub, en comparación con las que expresan MBD-RB. Este análisis confirmó que, efectivamente, la ubiquitinación observada se debía exclusivamente a la capacidad del módulo MBD1-RB de interaccionar con la E2 ligasa.



**Figura 22.** H2AK119Ub en heterocromatina pericentromérica restaura los defectos replicativos. (A) Diagramas de sectores mostrando la distribución de fases presentes tras un pulso de EdU en cultivos transducidos con un virus control (vacío) y tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante) o transducidos con la proteína de fusión MBD1-RB y tratados con 4'-OHT (mutante +MBD-RB); n=3. (B) Fracción de los patrones de transición con respecto a las células control de los cultivos indicados. Te-M, transición de células en fase temprana a media de fase S; M-Ta, de fase media a tardía y Ta-Fin de fase tardía a fin de la replicación incluyendo el cultivo que expresa la proteína de fusión MBD-RBΔE3 tratado con 4'-OHT (mutante +MBD-RBΔE3); n=2. (C) Fracción de células de los cultivos indicados indicando tasa replicativa (incorporación de EdU), daño a DNA (RPA y 53BP1) y p21/CDKN1a. Los valores representan porcentaje de células totales (EdU y p21) o fracción dentro de células replicativas (RPA y 53BP1); n=2. \*\*, p < 0.003; \*\*\*, p ≤ 0.0004

Una vez restaurada la ubiquitinación en cromocentros, se estudió el proceso replicativo de las células que expresaban MBD1-RB. Se vio que, a pesar de no tener proteínas RING1, la

distribución de células presentes en cada una de las fases de la fase S, se revertía a las proporciones observadas en las células control (figura 22A). En línea con este resultado, la progresión a través de fase S, analizada mediante la aproximación de pulso y caza previamente descrita (figura 15), aparecía de nuevo en niveles similares al de las células control (figura 22B). De esta manera, el defecto de fase S observado en células deficientes en RING1A y RING1B quedaba corregido tras la deposición específica de H2AK119Ub en la región pericentromérica.

De forma análoga a los datos obtenidos con mutante  $\Delta E3$  de RING1B, al analizar el efecto de la proteína de fusión inactivada, MBD1-RB $\Delta E3$ , no recuperaba una replicación normal (figura 22B) relacionando de nuevo el efecto con la presencia de ubiquitina en las regiones pericentroméricas.

Como se muestra en el gráfico de la figura 22C, los niveles de estrés replicativo y sus roturas asociadas (células con focos de RPA y 53BP1 respectivamente) quedaron reducidos a niveles control tras la expresión de la proteína de fusión MBD1-RB, quedando así confirmado el rescate de progresión en fase S y sus consecuencias asociadas. Por otro lado y en relación a la especificidad reportada del módulo de ubiquitinación, el número de células replicativas medidas por incorporación de EdU, permanecía en niveles comparables con los observados en células deficientes en RING1A y RING1B (figura 22C). Poniendo en común este resultado con los niveles de ubiquitina detectados mediante ChIP en el promotor de *Cdkn1a/p21* (figura 21A) podemos deducir que, al igual que en las células doble mutantes, la reducción de entrada en ciclo en células que expresan MBD1-RB se debe a un aumento de la expresión del locus *Cdkn1a/p21*. Analizando los niveles de este regulador de ciclo mediante inmunofluorescencia observamos que, efectivamente, los niveles de CDKN1a/p21 en células MBD1-RB son indistinguibles de los cuantificados en células mutantes (figura 22C), apoyando así la especificidad del módulo de ubiquitinación a PCH.

El hecho de que las células que expresan la proteína de fusión sigan teniendo impedida la entrada en S aun sin presentar roturas en el DNA, permite extraer la conclusión de que la parada en ciclo que sufren las células RING1A y RING1B deficientes, no es debida a una activación de la respuesta a daño a DNA, si no a que, al menos en este sistema de estudio, la

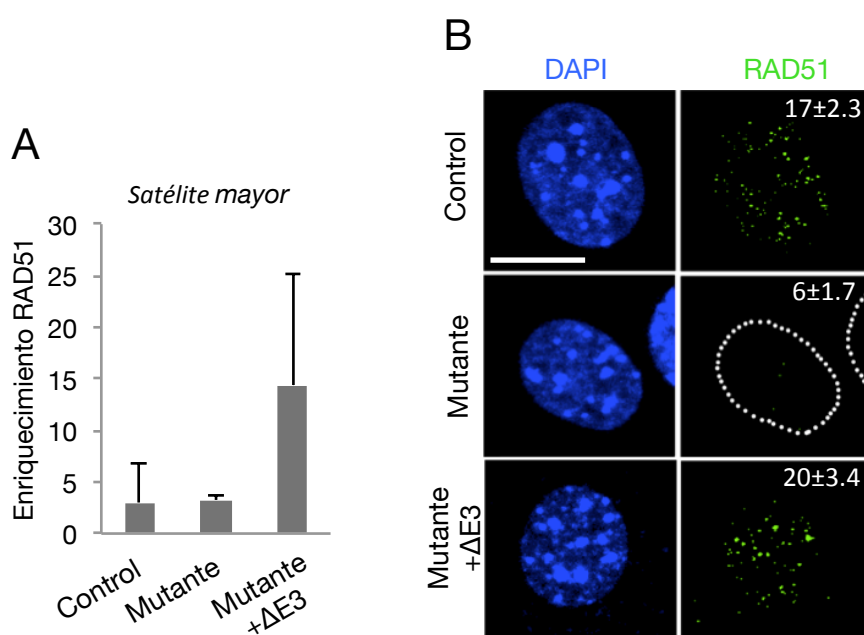
reducida fracción de células replicativas sería consecuencia directa de la upregulación de CDKN1a/p21 debido a la falta de ubiquitinación.

### **3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RING1 EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS REPLICATIVO**

#### **3.1 Fallo de reclutamiento de proteínas de estabilización de horquillas de replicación en ausencia de RING1A y RING1B**

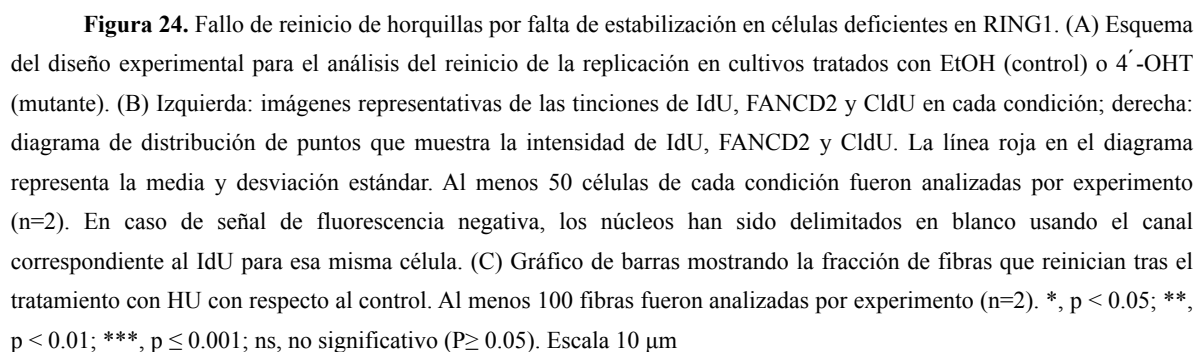
Hasta ahora ha sido descrita en este trabajo una función de RING1B en mantenimiento del estrés replicativo a nivel basal de forma dependiente de su actividad E3 ubiquitín ligasa. Sin embargo, los datos obtenidos de ausencia de daño a DNA en ese mismo mutante  $\Delta E3$  (figura 13B), anticipan una función añadida de RING1B. Existen en la célula rutas de estabilización de horquillas replicativas que se encuentran paradas por algún obstáculo, siendo capaces de reiniciar el proceso durante un tiempo (Petermann et al. 2010). En horquillas de replicación bloqueadas, esa capacidad de reinicio viene dada gracias a la formación de un filamento de protección frente a nucleasas por parte de RAD51 (Petermann et al. 2010; Schlacher, Wu, and Jasin 2012) proteína implicada en la reparación de DNA por recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR). Por tanto, a la vista de los resultados de asimetría de orígenes descritos en este trabajo (figura 10C), nos planteamos la posibilidad de un defecto de estabilización de las horquillas replicativas en células mutantes a causa de un fallo de reclutamiento de RAD51. Debido a la dificultad para detectar el RAD51 implicado en estabilización mediante inmunofluorescencia (Petermann et al. 2010), la medida de su reclutamiento se realizó mediante ChIP y posterior PCR cuantitativa en células control mutantes para ambas proteínas RING1, así como en células complementadas con el mutante  $\Delta E3$  de RING1B, sin inducción de estrés replicativo exógeno. Los resultados revelaron que mientras que tanto las células  $\Delta E3$  como doble mutantes mostraban un aumento de estrés replicativo medido como reclutamiento de RPA (figura 13B), sólo en las células  $\Delta E3$  se detectaba una acumulación de RAD51 con respecto a las células control (figura 23A). Para estudiar si la reparación por recombinación homóloga mediada por RAD51 estaba afectada, se trataron las células con hidroxurea (HU). Este tratamiento proporciona una fuente de estrés replicativo exógeno debido a que la HU provoca la inhibición de la ruta de síntesis de nucleótidos, forzando la replicación a una parada inmediata (Bianchi, Pontis, and Reichard 1986). Por tanto, se sometió a las células a un tratamiento prolongado de 24 horas de 2 mM HU, suficiente para inducir roturas por colapso de horquillas y su posterior reparación por recombinación homóloga (Schlacher, Wu, and Jasin 2012). Sin embargo, tampoco se detectó

RAD51 en las células mutantes en este caso (figura 23B). Por el contrario, como se puede ver en la figura 23B, en las células que expresan la versión  $\Delta E3$  aparece un aumento similar de focos de RAD51 detectados mediante inmunofluorescencia que en las células control. Estos resultados sugerirían que RING1B participaría de forma directa o indirecta en el reclutamiento de RAD51 para una correcta estabilización de horquillas así como para su posterior reparación por recombinación homóloga tras su rotura, de forma independiente de su actividad E3 ubiquitín ligasa.



**Figura 23.** La ausencia de proteínas RING1 provoca un fallo de reclutamiento de RAD51. (A) Análisis mediante ChIP-qPCR del enriquecimiento de RAD51 en las secuencias del satélite mayor en células tratadas con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante) sin perturbación externa. Los datos en el gráfico representan media y desviación estándar ( $n=3$ ). (B) Reclutamiento de RAD51 tras 24 horas de HU. Imágenes representativas de MEFs tratados con EtOH (control), 4'-OHT (mutante) y células que expresan la versión E3 mutada de RING1B (mutante + $\Delta E3$ ); Los números en las fotos representan media y desviación estándar ( $n=3$ ) de células RAD51 positivas (a partir de 5 focos). En caso de señal de fluorescencia negativa, los núcleos han sido delimitados en blanco usando el canal correspondiente al DAPI para esa misma célula. Escala 10  $\mu m$

Las proteínas de Anemia de Fanconi forman una ruta de reparación de puentes intercatenarios cuya mutación se caracteriza por hipersensibilidad a agentes que realizan entecruzamientos en el DNA, como la mitomicina C (W. Wang 2007; Kim and D'Andrea 2012). Sin embargo, la proteína FANCD2, perteneciente a este grupo, ha sido recientemente implicada en la ruta de tolerancia al estrés replicativo a través de la estabilización del filamento de RAD51 tras su carga en la horquilla bloqueada (Petermann et al. 2010;



76

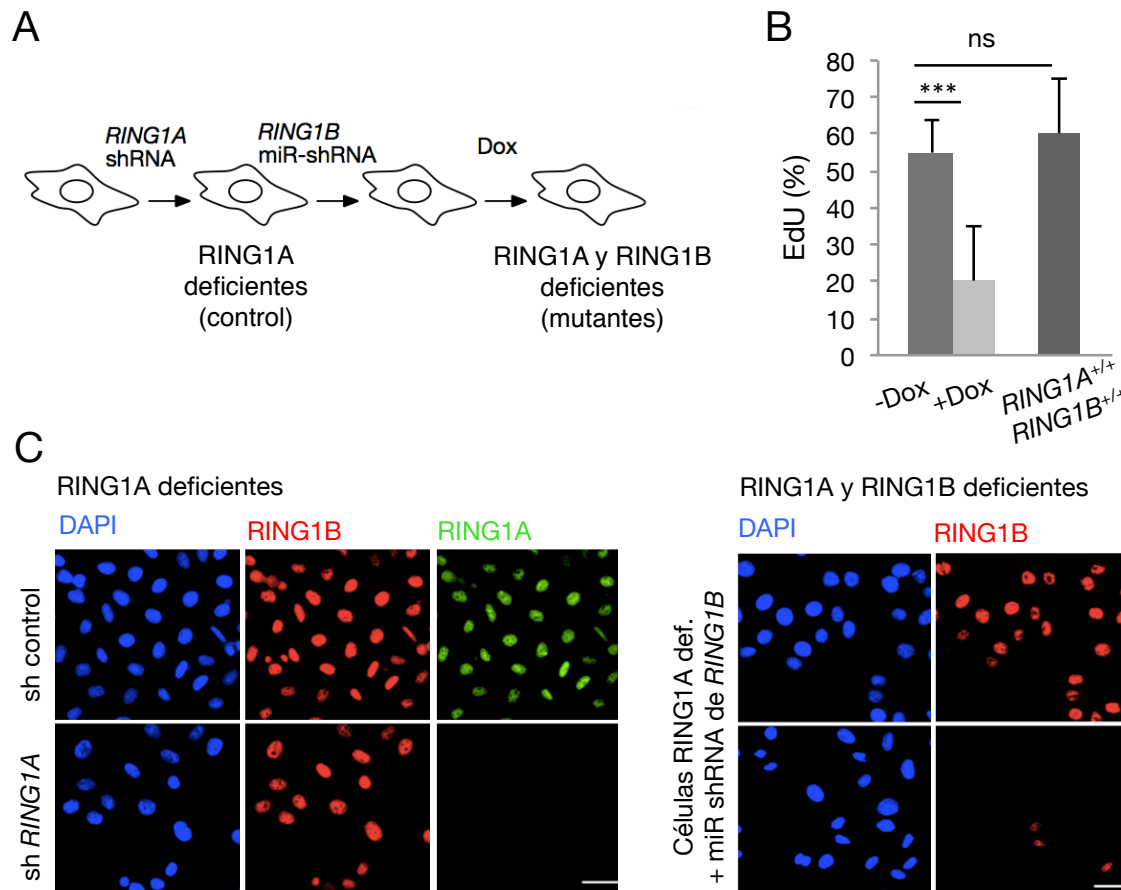


que provoca una parada en las horquillas sin inducir su rotura (Petermann et al. 2010). Según se muestra en el esquema del diseño experimental (figura 24A), los MEFs, tras 48 horas de tratamiento con EtOH/4'-OHT, fueron pulsados durante 20 min con el análogo de timidina IdU y tratados con HU para inducir una parada en las horquillas que hubieran incorporado. Tras la retirada de la droga, se analizó el reclutamiento de FANCD2 y la reincorporación de nucleótidos en horquillas replicativas a través de un segundo pulso con el análogo de timidina CldU. De esta manera, se puede ver si en el caso de existir un fallo de reclutamiento de FANCD2, tiene asociado un defecto de reinicio de la replicación. Al analizar el experimento mediante tinciones específicas de inmunofluorescencia, pudimos observar que, mientras en el control aparece un patrón de localización normal de FANCD2 en los focos de incorporación del nucleótido (Howlett 2005; Hussain 2004) iniciados en el primer pulso de IdU (figura 24B), solo se aprecia una señal débil de FANCD2 en el caso de las células mutantes (figura 24B). Se observa claramente en las imágenes que en las células control el reclutamiento de FANCD2 va acompañado de una reincorporación del segundo nucleótido tras el tratamiento con HU, mientras que en las células mutantes el reinicio de la síntesis aparece muy disminuida. Mediante el análisis digital de intensidad de fluorescencia de las imágenes (figura 24B, derecha) se confirma el resultado anticipado visualmente: mientras que la incorporación del primer nucleótido aparece en intensidades similares en el mutante y el control ( $p=0.35$ ), la distribución de intensidades de los marcajes correspondientes a FANCD2 y CldU aparecen significativamente menores en el caso de las células mutantes ( $p=0.04$ ,  $p=0.007$  respectivamente).

Para obtener una medida del reinicio de horquillas replicativas a nivel molecular se analizaron fibras de DNA siguiendo el mismo esquema experimental que en el ensayo de inmunofluorescencia (figura 24A). Así, la tinción de moléculas individuales de DNA reveló que la fracción de las mismas que había incorporado ambos nucleótidos, signo de que habían reiniciado la replicación tras el tratamiento con la droga bloqueante, era inferior a la mitad en las células mutantes con respecto a células control (figura 24C), confirmando el fallo de reinicio reportado anteriormente. El hecho de que la extensión del defecto de reinicio aparezca de mayor magnitud mediante inmunofluorescencia, que el medido en fibras de DNA, es probablemente debido a la mayor capacidad de resolución de la segunda aproximación. Con estos resultados obtenidos a partir de diferentes técnicas podemos

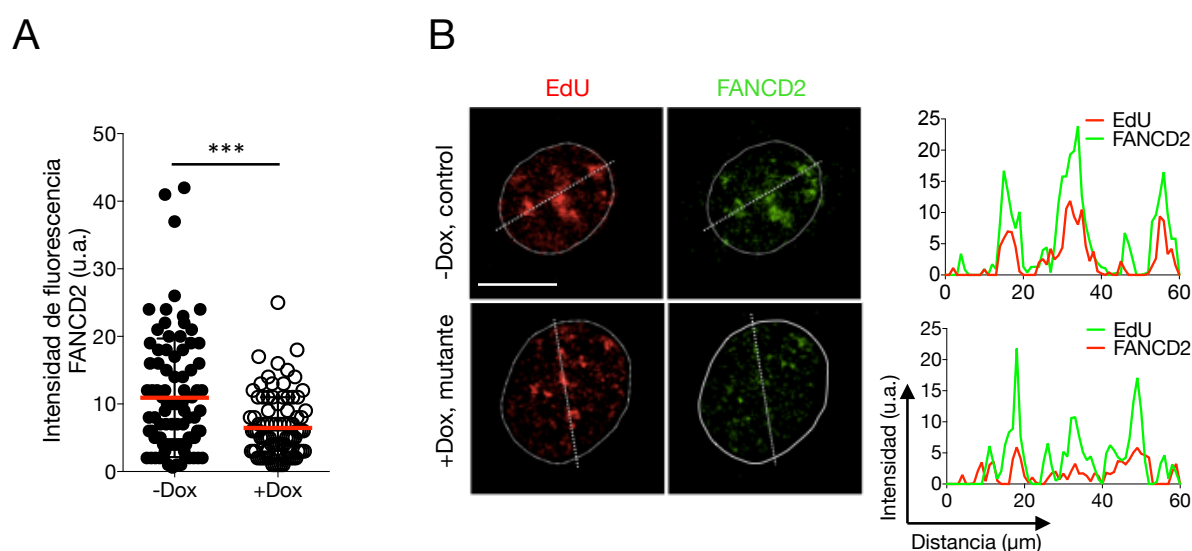
concluir que en ausencia de RING1A y RING1B, existe un defecto de reinicio de horquillas replicativas sometidas a estrés replicativo debido a un reclutamiento inefficiente de FANCD2.

La estabilización de horquillas de replicación es un proceso complejo en el que participan gran cantidad de proteínas. Con el propósito de estudiar en mayor profundidad la afectación de la vía y debido a la existencia de buenos anticuerpos para la detección de proteínas de la ruta de estabilización en células humanas, se reprodujo el modelo de pérdida de función de proteínas RING1 en células HeLa. Como se puede ver en el esquema del flujo experimental (figura 25A), las células fueron transducidas con un lentivirus de expresión constitutiva de un shRNA específico para *RING1A* y tras su selección por medio de



**Figura 25.** Modelo de inactivación de las proteínas RING1 en células HeLa. (A) Las células son transducidas con un lentivirus que expresa el shRNA para la inactivación específica de *RING1A*. Tras 5 días de selección, son transducidas con un shRNAmir- que inactivará *RING1B* de forma inducible por doxiciclina (Dox). Las células RING1A deficientes son usadas como control de los experimentos. (B) Tasa de incorporación de EdU tras la inactivación condicional de *RING1B*. Los valores representan media y desviación estándar (n=3). (C) Imágenes representativas que ilustran la eficiencia desaparición de la proteína RING1A (izquierda) y posteriormente de RING1B (derecha). \*\*\*,  $p < 0.001$

antibióticos, con un segundo lentivirus que expresaba de forma dependiente de Doxyciclina, (Dox) un shRNAmir (microRNA-adapted shRNA) específico de *RING1B*. De esta manera, tras 48 horas de inducción del sistema, resulta en un inactivación eficiente de ambas proteínas RING1 (figura 25C). Al igual que en MEFs, la falta de proteínas RING1 en HeLa producía una significativa reducción de la fracción de células que incorporaban EdU (figura 25B). Teniendo en cuenta que la incorporación observada en células HeLa deficientes en RING1A no presenta diferencias con respecto a HeLa sin modificar (*RING1A*<sup>+/+</sup>, *RING1B*<sup>+/+</sup>), en adelante los cultivos correspondientes serán referidos como control: células sin inducción con doxyciclina, RING1A deficientes; mutante: células tratadas con doxyciclina, deficientes en RING1A y RING1B.

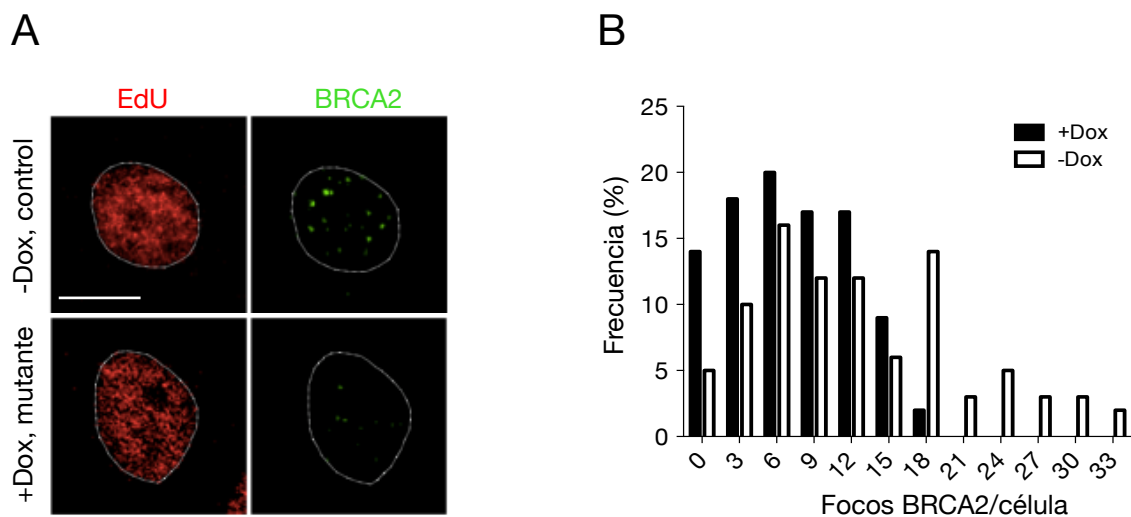


**Figura 26.** Fallo de reclutamiento de FANCD2 en células deficientes en RING1A y RING1B. (A) Diagrama de distribución de intensidades de fluorescencia de FANCD2 en células HeLa control (-Dox) y mutantes (+Dox) tratadas con hidroxiurea. Al menos 90 células fueron analizadas por experimento. La línea roja en el diagrama representa media y desviación estándar (n=2). (B) Imágenes representativas del reclutamiento de FANCD2 en condiciones control (arriba) y mutante (abajo), acompañadas del histograma de intensidad de ambas fluorescencias a través del segmento nuclear marcado con una línea blanca en cada imagen. \*\*\*,  $p < 0.001$ . Escala 10  $\mu\text{m}$

Con el fin de determinar si el defecto de localización de FANCD2 en condiciones de estrés descrito en MEFs deficientes en RING1A y RING1B era reproducible en este nuevo modelo celular, se llevó a cabo un ensayo análogo al descrito en la figura 24A, en el que 48 horas después de la inducción de los shRNA, las células se trataron una hora con 4 mM HU previo pulso de 20 minutos con el análogo de timidina EdU. Tras las tinciones específicas de inmunofluorescencia, el análisis digital de las imágenes reveló que, al igual que en MEFs, la

distribución de intensidades de fluorescencia correspondientes a FANCD2 era significativamente menor en el caso de las células mutantes (+Dox,  $p=0.0005$ , figura 26A). El análisis de la fluorescencia de EdU y FANCD2 a través de un segmento nuclear (línea blanca en las imágenes de la figura 26B) reveló que mientras en las células control la fluorescencia de EdU y la de FANCD2 colocalizaban prácticamente en su totalidad (figura 26B, arriba), no ocurría así en las células mutantes (figura 26B, abajo), revelando además de un defecto de magnitud del reclutamiento, un defecto en la correcta localización de FANCD2.

Otra proteína que al igual que RAD51 y FANCD2, actúa en la estabilización de horquillas previa a la aparición de roturas es la proteína BRCA2, (Hashimoto, Chaudhuri, and Lopes 2015; Lomonosov et al. 2003; Schlacher, Wu, and Jasin 2012; Schlacher et al. 2011), además de participar en su posterior reinicio (Buisson et al. 2014). Por ello, para investigar la



**Figura 27.** Fallo de reclutamiento de BRCA2 en células HeLa deficientes en RING1A y RING1B. (A) Imágenes representativas del número de focos de BRCA2 en células tratadas con HU en condiciones control (-Dox) y mutantes (+Dox); (B) análisis de la distribución de puntos por célula en cada una de las condiciones indicadas. Al menos 100 células fueron analizadas por experimento ( $n=2$ ). Escala 10  $\mu\text{m}$

afectación de la localización de BRCA2 se trataron células HeLa control y mutantes para RING1A y RING1B con 4 mM HU para su posterior tinción. Como se puede ver en la figura 27, tanto en las imágenes como en la distribución de frecuencias de focos/célula, BRCA2 aparece muy reducida en el caso de las células mutantes, resultado similar al reportado para FANCD2.

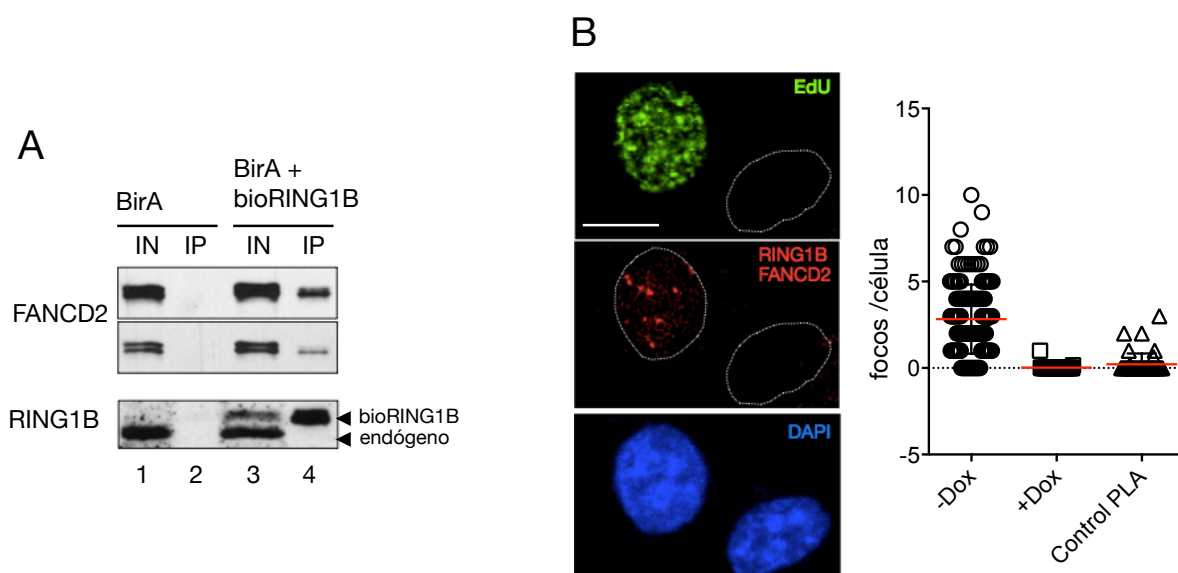
Con estos datos obtenidos de estudios en dos tipos celulares podemos concluir que, en ausencia de las proteínas RING1A y RING1B se produce un defecto en la localización de FANCD2, que afecta a otros niveles de la ruta de estabilización como son RAD51 y BRCA2, impidiendo el reinicio de las horquillas paradas, pudiendo ser por tanto, la causa de las roturas detectadas en el DNA.

### **3.2 RING1B interacciona con la proteína de estabilización FANCD2**

Con el fin de determinar si la carga ineficiente de FANCD2 se debiera a la necesidad de una interacción directa con RING1B perdida en ausencia del mismo, realizamos distintas aproximaciones. Se generó una línea celular estable mediante transfección de células HEK293T con un plásmido portador del gen de la biotín ligasa BirA de la bacteria *Escherichia coli*. Además se introdujo en estas células el cDNA de RING1B etiquetado con una secuencia biotinilable de 23 aminoácidos fusionados en fase en su extremo 5' (bioRING1B). Para los experimentos se seleccionaron clones celulares que presentaran niveles similares tanto del bioRING1B exógeno como de RING1B endógeno, de forma que las interacciones endógenas se perturbaran lo menos posible. De esta manera, en las células que expresan ambos cDNAs (células BirA-bioRING1B) se genera una forma de RING1B biotinilado, capaz de ser aislado junto con las proteínas que estuvieran interaccionando con él mediante técnicas de inmunoprecipitación. A modo de control del sistema, se generó otra línea celular en la que solo se introdujo el gen de la biotín ligasa, permitiendo identificar interacciones inespecíficas (células BirA). Mediante fraccionamiento subcelular, aislamos la proteína soluble con DNAsa que contiene la fracción de proteínas unidas a cromatina. Posteriormente se realizó la inmunoprecipitación usando bolas magnéticas acopladas a estreptavidina, proteína con gran afinidad por la biotina. Como se puede ver en la figura 28A, al analizar la membrana de WB con anticuerpos específicos de las proteínas FANCD2 y RING1B se detectan ambas proteínas en los extractos previos a la inmunoprecipitación tanto en células BirA como BirA-bioRING1B (IN, carriles 1 y 3). Por el contrario, al analizar el inmunoprecipitado (IP, carriles 2 y 4), sólo en el caso de las células que expresan la forma biotinilable de RING1B se detecta unión de FANCD2 y RING1B exógeno (banda de menor movilidad), denotando la especificidad de la interacción entre FANCD2 y RING1B detectada. Al hacer una exposición más corta, se aprecia una doble banda de FANCD2

correspondiendo con su forma sin modificar (mayor movilidad electroforética), y la forma ubiquitinada de FANCD2 (menor movilidad). Sorprendentemente los resultados apuntan a una unión preferencial de RING1B a la forma no ubiquitinada de FANCD2.

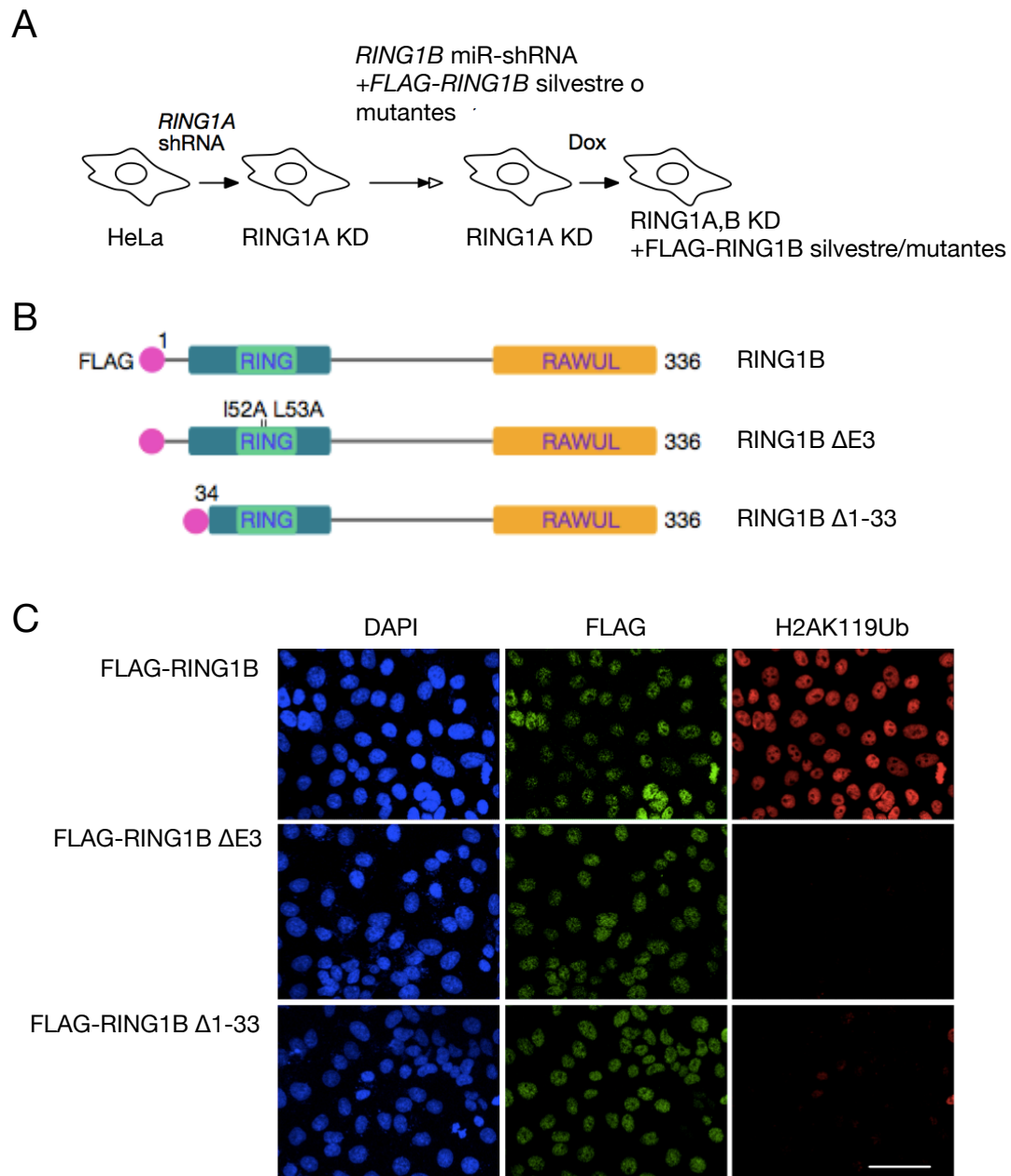
Para analizar la interacción entre RING1B y FANCD2 en un ambiente celular y con proteínas endógenas, utilizamos la técnica de ensayo de ligación por proximidad (proximity ligation assay, PLA). Esta técnica permite identificar incluso interacciones directas débiles o transitorias entre proteínas con resolución molecular, ya que se detectarán interacciones entre proteínas a menos de 40Å de distancia, lo que nos dará un foco positivo de fluorescencia mediante una amplificación de PCR de círculo rodante (ver métodos).



**Figura 28.** RING1B interacciona con FANCD2. (A) Inmunoprecipitación de RING1B en células BirA (control) y BirA+bioRING1B tratadas con HU. IN, input; IP, inmunoprecipitado. El inmunoprecipitado fue analizado usando anticuerpos anti-FANCD2 y anti-RING1B. En la exposición más corta se aprecia la doble banda resultante de la ubiquitinación de FANCD2 en respuesta a estrés replicativo. Las dos bandas obtenidas con anti-RING1B corresponden a la forma biotinilada de RING1B (menor movilidad) y a la proteína RING1B endógena (mayor movilidad). (B) Izquierda: imágenes representativas de células tratadas con HU que muestran la aparición de focos de PLA exclusivamente en células replicativas; derecha: diagrama de puntos mostrando el análisis de la frecuencia de puntos por célula en cultivos -Dox (control) y +Dox (mutantes). La línea roja en el diagrama representa la media de 50 células replicativas por experimento (n=2). El control negativo de PLA corresponde a una preparación sin el anticuerpo RING1B. Escala 10 μm.

Así pues, en nuestro modelo de pérdida de función en células HeLa (figura 25), se realizó un ensayo de PLA en células sin o con inducción por Doxicielina (control y mutantes para RING1A y RING1B respectivamente) usando anticuerpos anti-RING1B y anti-FANCD2. Posteriormente, las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal fueron sometidas a análisis digital para obtener de forma objetiva el número de señales positivas por

célula en cada condición experimental. Como se puede ver en la figura 28B, izquierda, se observa que los focos de interacción aparecen en células que presentan una señal positiva



**Figura 29.** Modelo de sobreexpresión de formas mutantes de RING1B en células HeLa. (A) Las células son transducidas con lentivirus que expresan el shRNA para la inactivación específica de *RING1A*. Tras 5 días de selección, son transducidas con un shRNAmir que inactivará la expresión de *RING1B* endógeno mientras que induce la expresión de las distintas formas de FLAG-RING1B de manera inducible por Dox. (B) Esquema de las distintas formas de RING1B sobreexpresadas. (C) Imágenes representativas que muestran la expresión de las formas exógenas de RING1B (anti-FLAG) y sus distinta capacidad de ubiquitinación de H2A (anti-H2AK119Ub) tras 48 horas de inducción con Dox.

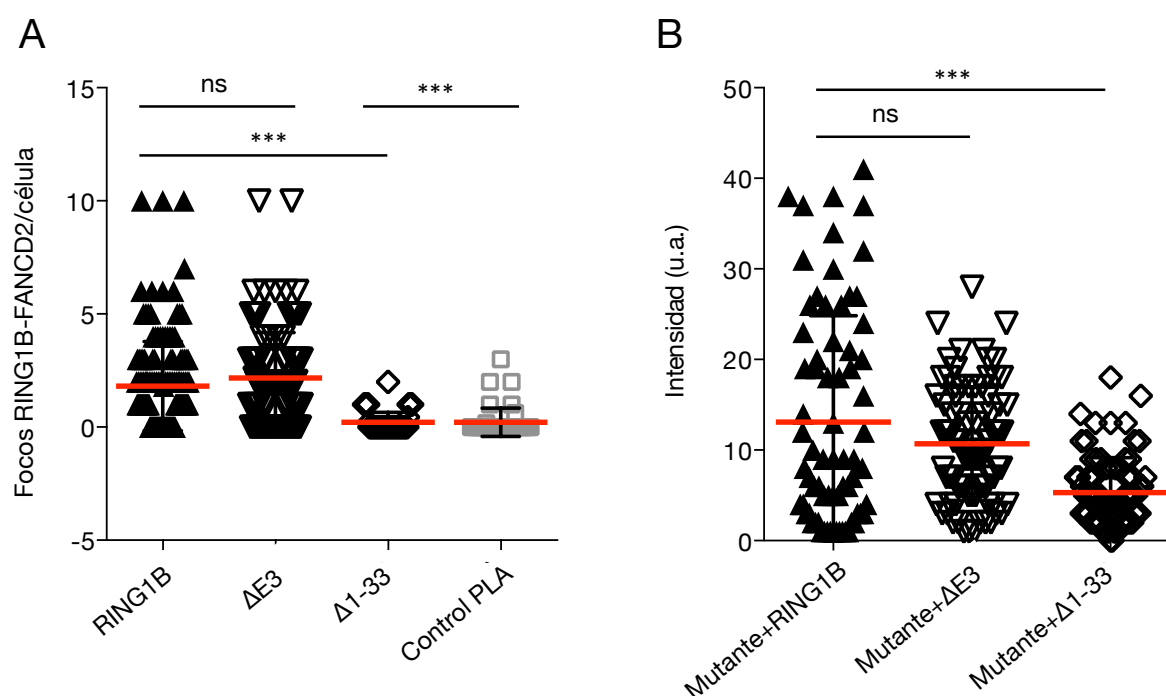
para el análogo de timidina EdU. De esta manera, además de confirmar la interacción descrita mediante co-inmunoprecipitación, la resolución de célula única que permite esta

aproximación reveló que la interacción RING1B-FANCD2 se restringía a células replicativas (imágenes en figura 28B). La distribución de focos por célula muestra un elevado número de los mismos en células que tienen RING1B (-Dox) en comparación con las células mutantes (+Dox) (figura 28B, derecha). A modo de control negativo, en el ensayo se incluyó una preparación de células con RING1B, en el que sólo se añadió uno de los anticuerpos, permitiendo así cuantificar la señal inespecífica del experimento. Por tanto, comparando los focos de interacción de RING1B-FANCD2 tanto con los presentes en células deficientes en RING1B como con los que aparecen en el control negativo podemos concluir que la interacción entre RING1B y la proteína FANCD2 es específica, quedando así confirmado el resultado obtenido por inmunoprecipitación.

Una vez determinada la existencia de una interacción específica entre RING1B y FANCD2, nos preguntamos de qué manera se vería afectada por distintos mutantes de RING1B. Para ello realizamos ensayos de complementación en células HeLa con las formas silvestre y dos formas mutantes de RING1B, uno en el que se había eliminado la actividad E3 ligasa mediante las mutaciones IL53,55A ( $\Delta E3$ ); y otro mutante cuyo cDNA presenta una delección de 33 aminoácidos en el extremo amino-terminal (N-terminal, en adelante  $\Delta 1-33$ ) (figura 29B). Para combinar la delección del gen endógeno de *RING1B* con la sobreexpresión de las distintas formas exógenas, se llevó a cabo la construcción de plásmidos que expresaran, de forma inducible por Doxyciclina, los cDNA codificantes para *RING1B* silvestre o mutantes junto con el shRNAmir específico para *RING1B*. Así, al tratar las células con doxyciclina, queda inactivada la expresión del gen endógeno, pero no del exógeno, debido a que la diana del shRNAmir se encuentra en el 3'UTR ausente en el cDNA lentiviral (figura 29). Una vez seleccionadas las células e inducida la expresión de las formas de RING1B exógenas mediante la adición de doxyciclina al cultivo, llevamos a cabo el ensayo de PLA. En este caso se usó un anticuerpo anti-FLAG, etiqueta que portan las formas de RING1B introducidas, de forma que nos aseguramos la detección de la interacción de las proteínas exógenas frente a un posible remanente de RING1B endógeno tras la inducción de los shRNAs. Analizando de forma digital las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal del ensayo de PLA, obtuvimos que, mientras con la forma silvestre y  $\Delta E3$  aparecía un número de focos significativamente diferentes a los detectados en el control de PLA ( $p \leq 0.0001$  en ambos casos), no ocurría así en el caso del mutante  $\Delta 1-33$ , que aparecía en un



rango de número de focos muy similar a lo obtenido en el control negativo y por tanto inespecífico ( $p=0.8$ , figura 30A). Para estudiar una posible relación entre la interacción con RING1B y la magnitud de carga de FANCD2 en condiciones de estrés replicativo, tratamos las células con 4mM HU durante una hora. Tras el tratamiento se cuantificó FANCD2 por inmunofluorescencia, observándose (figura 30B) una reducida intensidad en las células  $\Delta 1-33$  respecto a las células que expresaban las versiones silvestre y  $\Delta E3$  de RING1B (figura 30B). Con estos resultados podemos concluir que la focalización de FANCD2 normalmente observada en células sometidas a estrés replicativo, es deficiente en células sin RING1, probablemente por no asociarse con RING1B a través regiones específicas (ver el efecto de la delección del extremo N-terminal), independientemente de la actividad E3 ligasa de RING1B.



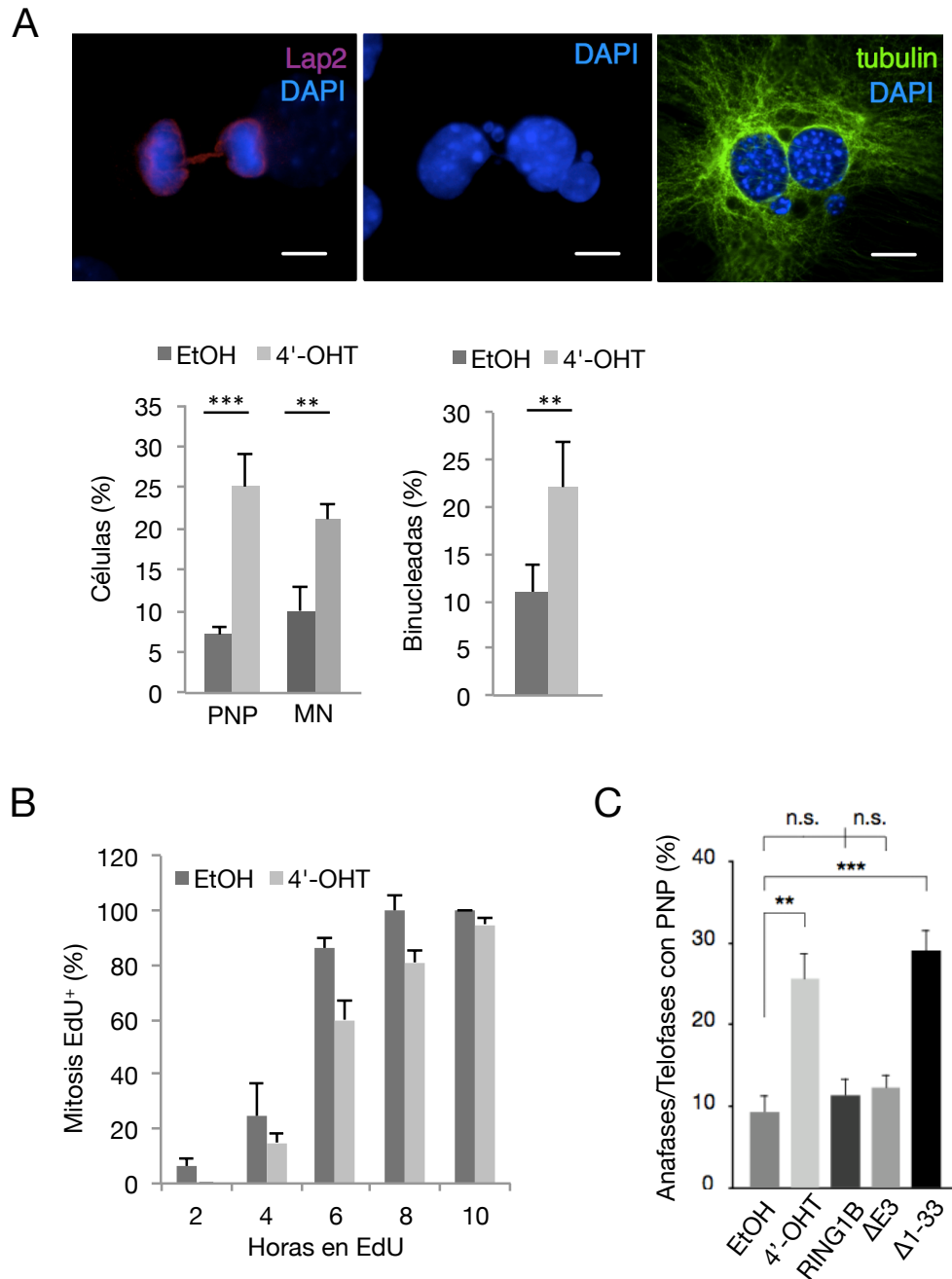
**Figura 30.** Interacción de FANCD2 con mutantes de RING1B. (A) Diagrama de distribución de puntos mostrando los focos por célula en el ensayo de PLA con anticuerpos anti-FLAG y anti-FANCD2, ilustrando la diferente capacidad de interacción con FANCD2 de las formas de RING1B indicadas en cada caso. La línea roja en el diagrama representa la media y la desviación estándar. Al menos 80 células fueron analizadas por experimento y condición ( $n=2$ ). (B) Diagrama de puntos mostrando la distribución de intensidades de fluorescencia de FANCD2 en cada una de las condiciones indicadas. El gráfico muestra las medidas de intensidad de al menos 100 células por experimento y condición ( $n=2$ ). La línea roja en ambos diagramas representa la media y la desviación estándar \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ ; ns, no significativo

### 3.3 Aberraciones mitóticas en ausencia de RING1A y RING1B.

Un estrés replicativo sin reparar puede conllevar la aparición de estructuras aberrantes en mitosis que provocan pérdidas cromosomales o puentes nucleoplásmicos (Wilhelm et al. 2014). Mediante análisis por inmunofluorescencia de las mitosis en MEFs control y mutantes (EtOH/4'OHT, respectivamente) llevamos a cabo una cuantificación de este tipo de estructuras. Al analizar la fracción de anafases y telofases que presentaban puentes nucleoplásmicos encontramos un porcentaje significativamente mayor en células mutantes (figura 31A). En línea con este resultado, la proporción de células con micronúcleos también era mayor en el caso de las células mutantes (figura 31A). Por otro lado, se observa un alto porcentaje de células binucleadas, como resultado probablemente de un defecto de citocinesis (figura 31A, derecha)

La presencia de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos son síntomas asociados a daño a DNA en replicación, lo que también provoca un retraso de la entrada en mitosis (Fenech et al. 2010; Bartek and Lukas, 2007). Para investigar la dinámica de entrada en mitosis, cultivos de células mutantes y control fueron sometidos a crecimiento en medio con EdU. La cuantificación de mitosis marcadas con EdU con respecto al tiempo, reveló una entrada retrasada en mitosis en el caso de las células mutantes (figura 31B)

Con el fin de investigar el efecto que los mutantes de RING1B tenían sobre la aparición de estas aberraciones mitóticas se transdujeron MEFs con las versiones  $\Delta E3$  mutada y  $\Delta 1-33$  de RING1B. Al analizar las figuras mitóticas de estas células 48 horas después de la adición de EtOH/4'-OHT al cultivo, descubrimos que el número de anafases/telofases que presentaban puentes nucleoplásmicos en mutante de  $\Delta E3$  era muy similar a lo observado en las células control. Sin embargo, en el caso del mutante  $\Delta 1-33$  el porcentaje de anafases/telofases afectadas no presentaba diferencias con respecto a las células deficientes en RING1A y RING1B. Con estos datos podemos concluir que el defecto observado en mitosis en las células deficientes en proteínas RING1 es independiente de la actividad E3 ligasa de RING1B. Sin embargo, de forma análoga a los datos aportados de reclutamiento de FANCD2, el dominio N-terminal parece ser necesario para evitar la aparición de aberraciones mitóticas.



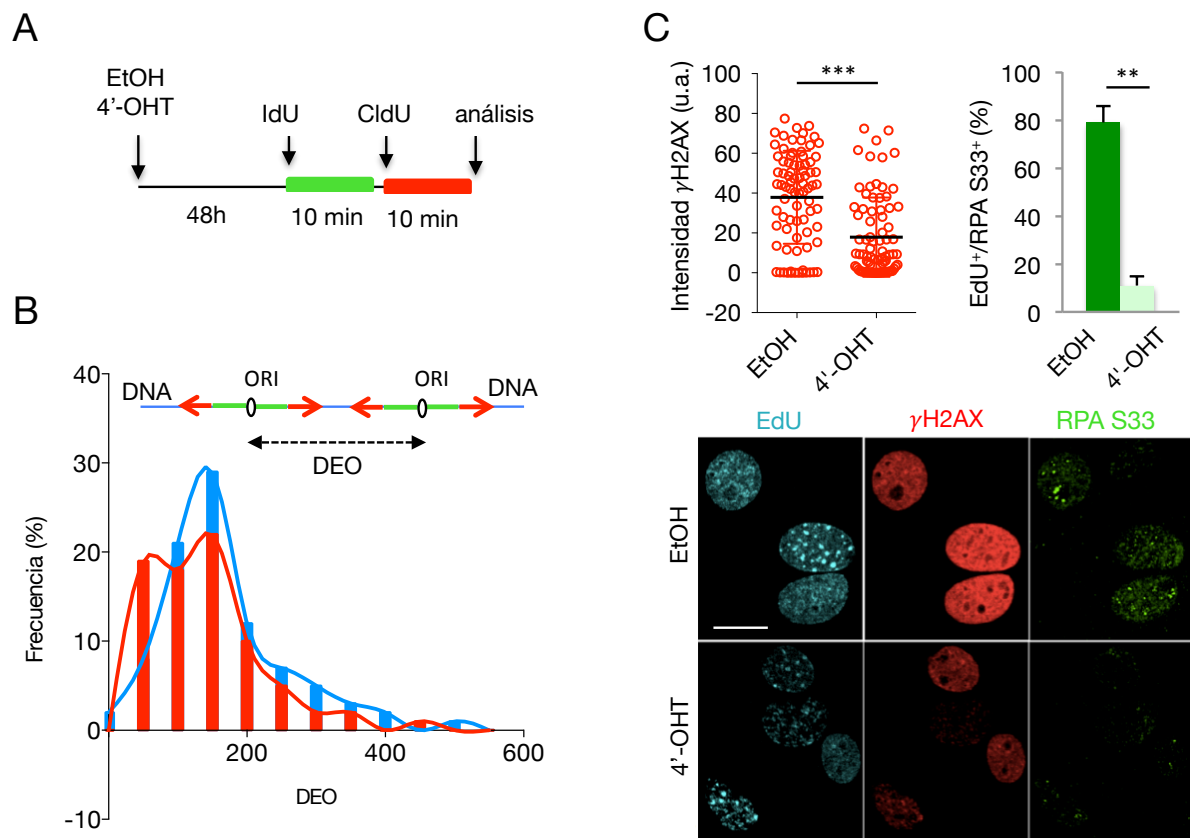
**Figura 31.** Aberraciones mitóticas en ausencia de proteínas RING1. (A) Arriba: imágenes representativas de células con puentes nucleoplásmicos en anafase, mostrando micronúcleos y células binucleadas; abajo: los histogramas muestran porcentaje de células en anafase/telofase con puente nucleoplásmico (PNP) y porcentaje de células totales que presentan micronúcleos (MN) o binucleación. Los gráficos muestran media y desviación estándar de al menos 200 células analizadas por experimento (n=4). (B) Análisis de la dinámica de entrada en mitosis de células crecidas en medio con EdU, n=2. (C) Análisis de defectos mitóticos en células mutantes transducidas con las distintas formas de RING1B en comparación con células control (EtOH) o mutantes (4'-OHT). El gráfico muestra media y desviación estándar (n=3). \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns, no significativo.

## 4. RING1 Y PUNTO DE CONTROL DE FASE S

### 4.1 Ineficiente señalización ante el estrés replicativo en células deficientes en proteínas RING1

Existen rutas de transducción en la célula que permiten la señalización y reparación del daño a DNA, por lo que nos preguntamos el efecto que el estrés replicativo y las roturas en DNA observadas en células deficientes en RING1A y RING1B estaría teniendo sobre la activación de estas rutas de señalización. ATR es la principal kinasa responsable de la vía de estrés. Aunque sus funciones exactas en estabilización de horquilla una vez activada continúan bajo estudio, parece claro que los dos grandes efectos de su activación a través de funciones de la kinasa efectora de la ruta, Chk1, son la inhibición de la progresión del ciclo celular y la supresión del disparo de los orígenes de reserva. De esta manera, se proporciona tiempo para la resolución del estrés, conservando los orígenes de reserva para completar la síntesis desde orígenes vecinos si fuera necesario. Así pues, para determinar si la inhibición del disparo de orígenes como consecuencia de una activación de ATR estaba teniendo lugar, recurrimos al estudio molecular de fibras de DNA en células en estado basal. Como se muestra en el esquema del diseño experimental de la figura 32A y siguiendo los criterios de análisis mostrados en la figura 32B, se midió la distancia entre los orígenes de replicación existentes en los cultivos de MEFs control y mutante. Los datos obtenidos revelaron que la distancia entre orígenes en las células mutantes presentaba una tendencia a una reducción en la distancia entre ellos figura (32B). Esto indicaría un disparo de orígenes aumentado probablemente como consecuencia de un incremento de las paradas que originan la asimetría observada (figura 10C), apuntando a un fallo en la activación de ATR o una activación ineficiente.

ATR media la fosforilación de la proteína RPA en la serina 33 (RPA S33) en horquillas de replicación sometidas a estrés replicativo. Esta modificación participa en la estabilización de la horquilla mediando su posterior reinicio (Murphy et al. 2014; Vassin et al. 2009). Con el propósito de confirmar la falta de activación de ATR en ausencia de proteínas RING1, analizamos el estado de fosforilación de RPA. Para ello, 48 horas después del tratamiento con EtOH/4'-OHT, las células fueron pulsadas durante 20 minutos con EdU y se indujo una parada de horquillas replicativas mediante un tratamiento de una hora con 2 mM HU. Al



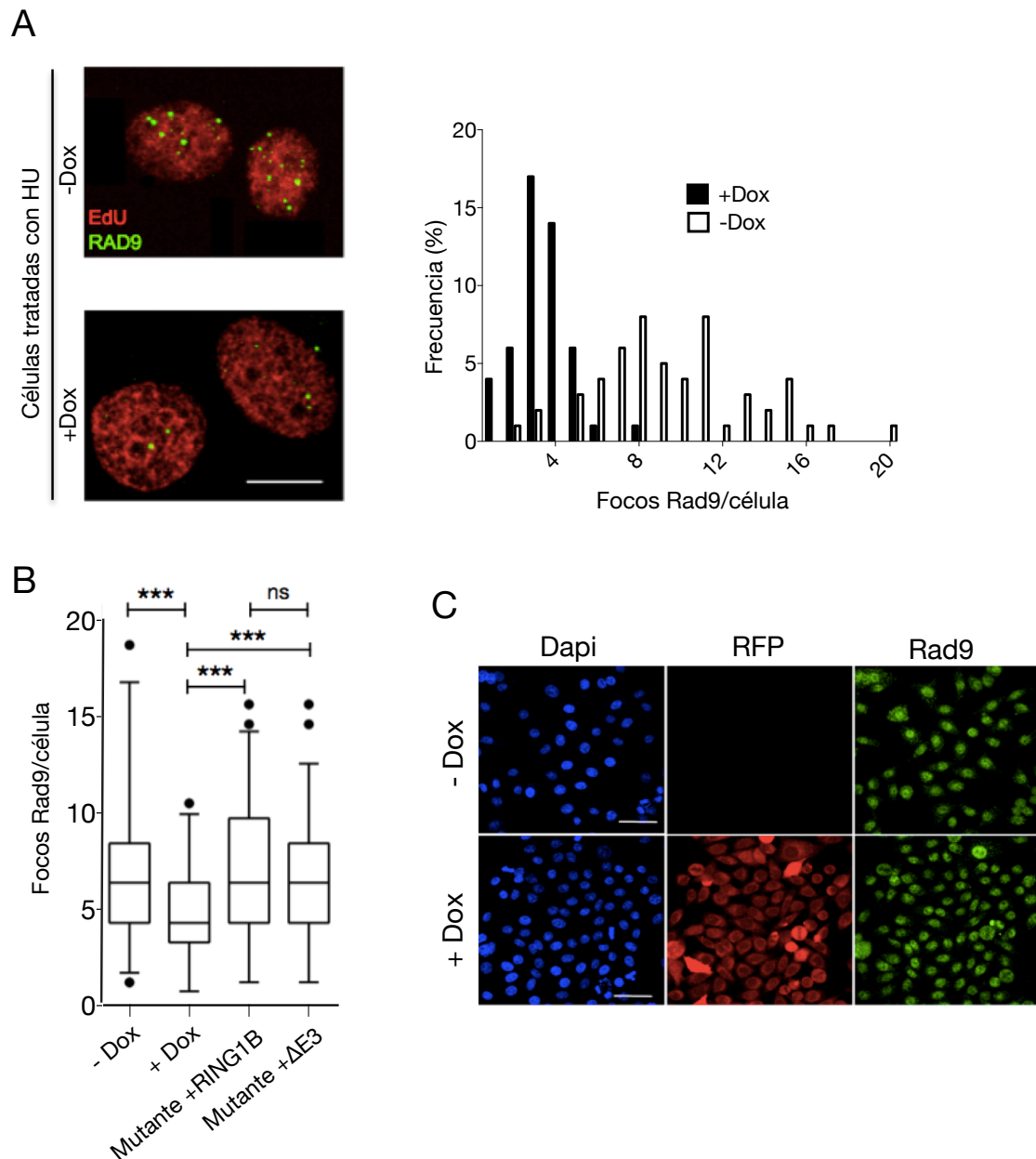
**Figura 32.** Defecto de activación de ATR en ausencia de RING1A y RING1B. (A) Esquema del diseño experimental para el análisis de la distancia entre orígenes (DEO). (B) Distribución de DEO en cultivos tratados con EtOH (control) o 4'-OHT (mutante) siguiendo el criterio de medición aportado en la figura. (C) MEFs sometidos a tratamiento con HU. Arriba izquierda, cuantificación de la intensidad de fosforilación de  $\gamma$ H2AX (distribución de intensidades de fluorescencia, media en negro); arriba derecha, cuantificación de fosforilación en RPA S33 (media y desviación estándar). Al menos 100 células fueron analizadas por experimento (n=3) en ambos casos; abajo: imágenes representativas de células control y mutantes ilustrando el defecto de fosforilación de  $\gamma$ H2AX y RPA. Escala 10  $\mu$ m. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

analizar las imágenes resultantes de la tinción de RPA S33 observamos en el caso de las células control, la practica totalidad de las células replicativas (EdU<sup>+</sup>) presentaban un patrón similar de fosforilación de RPA (figura 32C). Por el contrario, al analizar de la misma manera las células mutantes, se observó un claro defecto de fosforilación, disminuyendo drásticamente el número de células que presentan RPA S33. Por otro lado, al analizar digitalmente la intensidad de la fosforilación de  $\gamma$ H2AX en respuesta a HU, observamos una fosforilación muy reducida en el caso de las células mutantes (figura 32C), de acuerdo con la relación directa reportada previamente entre la fosforilación de ambas proteínas (Vassin et al. 2009). Estos datos demuestran que efectivamente, en ausencia de las proteínas RING1A y RING1B, existe una ineficiente activación de ATR, principal kinasa en la ruta de señalización de estrés replicativo.

## 4.2 Las proteínas RING1 están implicadas en el reclutamiento del complejo de daño a DNA 9-1-1

Estudios en diferentes organismos revelaron que en respuesta al estrés replicativo el complejo formado por las proteínas ATR-ATRIP es reclutado a las horquillas paradas a través del RPA unido al DNA de cadena sencilla (Zou and Elledge 2003). Sin embargo, su activación requiere de otras proteínas entre las que se encuentra el complejo heterotrimérico de la abrazadera del punto de control de daño, formado por las proteínas Rad9, Rad1 y Hus1, llamado también complejo 9-1-1. Este complejo, relacionado estructuralmente con la proteína PCNA (Eichinger and Jentsch, 2011), la abrazadera de la polimerasa replicativa, es llevado a cromatina por el complejo Rad17-RFC, donde interacciona con TopBP1 induciendo la activación por fosforilación de ATR (Lee et al. 2007; Delacroix et al. 2007 Kumagai et al. 2006). Así pues, nos preguntamos si el defecto de activación de ATR en nuestro sistema podría deberse a problemas relacionados con el posicionamiento del complejo 9-1-1. Usando el modelo de pérdida de función en células HeLa anteriormente descrito (figura 25), células sin o con inducción por Doxiciplina (células control y mutantes respectivamente) fueron expuestas a un tratamiento con 4 mM HU para detectar la carga de Rad9 mediante inmunofluorescencia. Al igual que lo reportado para la proteína RPA, la detección de Rad9 unido a cromatina implica un paso de pre-extracción celular que permite eliminar toda la proteína soluble no relacionada con el proceso replicativo. Así pues, al analizar los focos de Rad9 en células EdU positivas, se observó un defecto de su localización en el caso de las células mutantes (figura 33A, izquierda). Como se puede ver en el gráfico de distribución de frecuencias (figura 33A, derecha), las células mutantes presentan un menor número de puntos por célula que las células control. Para comprobar si la falta de detección de Rad9 en cromatina tras el tratamiento de HU se debiera a un efecto desconocido de RING1B sobre la estabilidad de esta proteína, se realizó una tinción sin extracción previa (figura 34). Con esta tinción se observó un nivel similar de proteína total en ambas condiciones, apuntando por tanto a un defecto real de unión a cromatina de Rad9 en ausencia de RING1B.

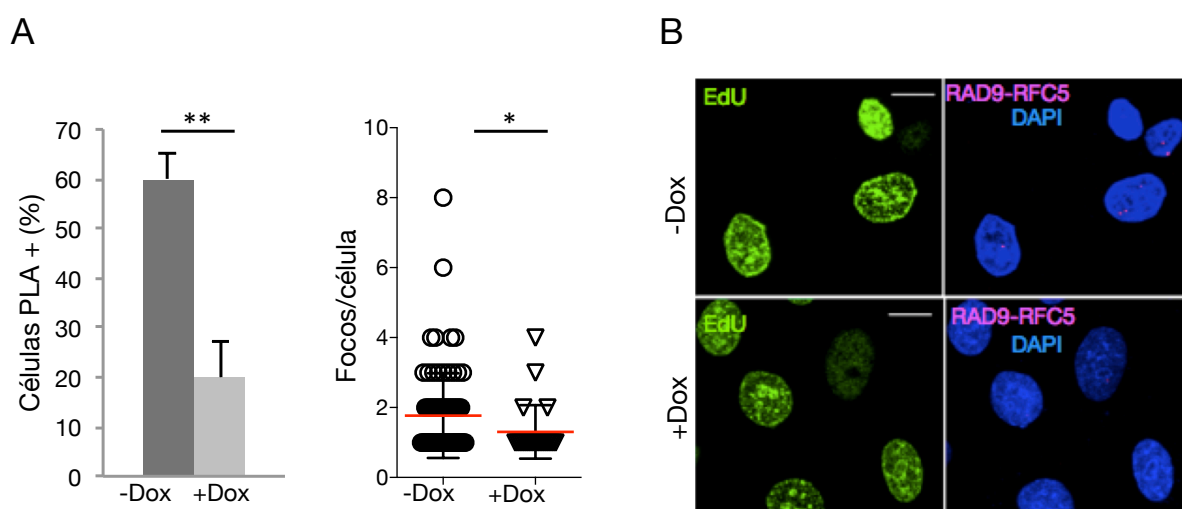
Para poder determinar si la aparición de roturas era consecuencia de este fallo de activación de ATR, estudiamos de nuevo el mutante  $\Delta E3$  de RING1B, que como he indicado antes (figura 13B) presenta estrés replicativo (RPA<sup>+</sup>) sin roturas en el DNA (53BP1<sup>-</sup>). Para analizar la magnitud de la carga de Rad9, transdujimos MEFs con retrovirus portadores de la



**Figura 33.** Reclutamiento inefficiente de Rad9 en ausencia de proteínas RING1. (A) Imágenes representativas de células HeLa control (-Dox) y mutante (+Dox) tras el tratamiento con HU. Gráfico de distribución de frecuencia de puntos por célula replicativa mostrando una drástica disminución de los mismos en células mutantes (+Dox). (B) La estabilidad de Rad9 no se ve afectada por la ausencia de proteínas RING1. La proteína roja fluorescente RFP se expresa de forma inducible por Dox, a modo de gen reportero del plásmido de expresión del shRNA. (C) Diagrama de cajas mostrando los puntos por célula en cultivos control (-Dox) y deficiente en proteínas RING1 (+Dox) en comparación con cultivos transducidos con las versiones silvestre (mutante +RING1B) y sin actividad E3 ligasa (Mutante +ΔE3) que refleja un rescate en el reclutamiento de Rad9 aun en ausencia de actividad E3 ligasa. Los datos representan valores de al menos 100 células replicativas de dos experimentos independientes. \*\*\*,  $p \leq 0.001$ ; ns, no significativo. Escala 10  $\mu\text{m}$

versión silvestre y  $\Delta\text{E3}$  de RING1B, además de un retrovirus vacío a modo de control. Una vez seleccionadas las células, y 48 horas después de la inducción con Dox, se siguió el procedimiento experimental de la figura 33A. Al analizar los focos de Rad9 por célula, observamos que en las células transducidas con el retrovirus control aparece un número

significativamente menor que en las células que expresan la versión silvestre de RING1B, situación análoga a la reportada con las células sin transducir sin o con doxyciclina (figura 33B). Sin embargo, al cuantificar la carga de Rad9 en las células  $\Delta E3$  se recupera un nivel similar al detectado en las células que expresan la versión silvestre de RING1B (figura 33B), indicando una independencia de la actividad E3 ligasa de RING1B en el reclutamiento de Rad9.



**Figura 34.** La proximidad de Rad9 a RFC5 en presencia de estrés replicativo se ve afectada en células deficientes en RING1A y RING1B. (A) Izquierda: cuantificación de células replicativas PLA positivas en células tratadas con HU en condiciones control (-Dox) y mutantes para RING1A y RING1B (+Dox); derecha: distribución de puntos por célula positiva en condiciones control y mutante. Al menos 100 células replicativas fueron cuantificadas en cada experimento (n=2). (B) imágenes representativas de los focos de interacción de RFC5-Rad9 en condiciones control (-Dox) y mutantes (+Dox). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . Escala 10  $\mu$ m

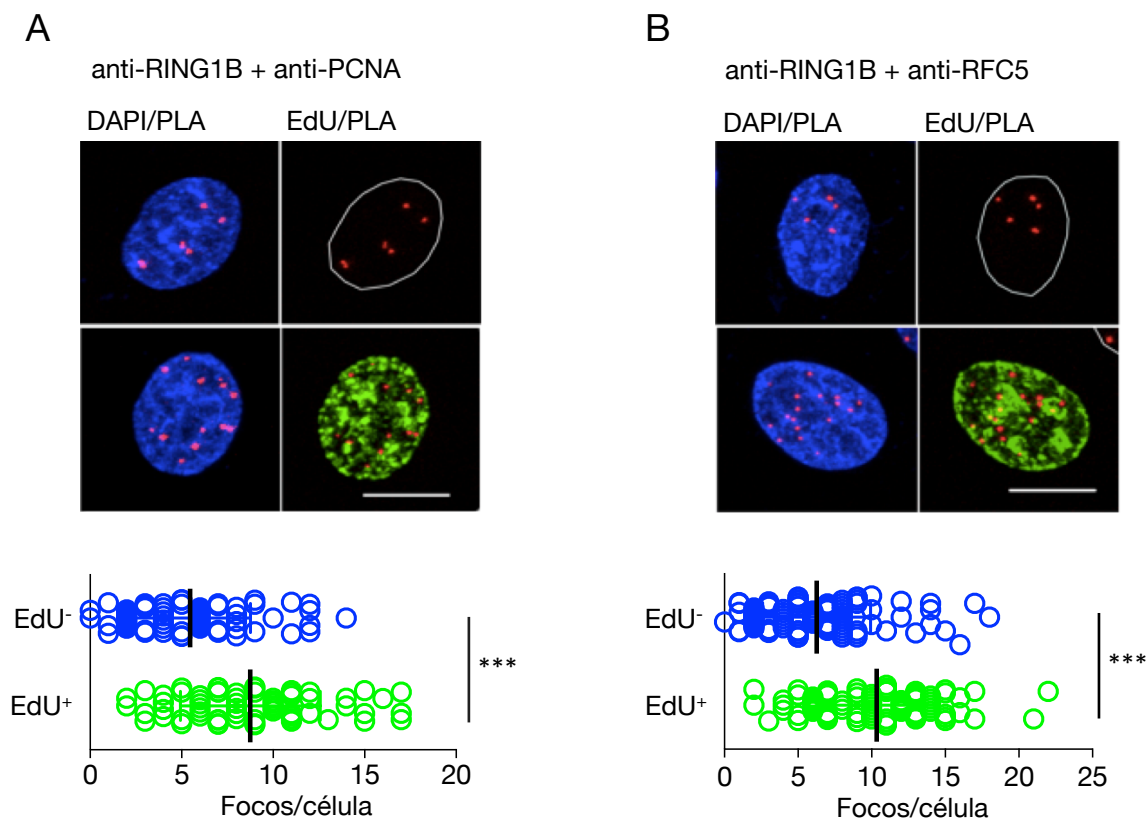
La proteína RFC5, es una subunidad común del complejo cargador de la abrazadera de la polimerasa replicativa (PCNA) y de la de estrés (9-1-1), por lo que para obtener evidencia adicional del fallo de carga de Rad9, realizamos un ensayo de ligación de proximidad entre estas dos proteínas. Para la realización del PLA, células HeLa control y mutantes (-Dox y +Dox respectivamente) fueron tratadas durante una hora con 4 mM HU. Al analizar los focos de interacción, observamos que en las células control existía mayor porcentaje de células positivas para focos de PLA que en las células mutantes (figura 34A, izquierda). Asimismo, como se muestra en el diagrama de dispersión de puntos (figura 34A, derecha), el número de focos detectados por célula positiva, también era significativamente menor en células mutantes en comparación con el control ( $p=0.02$ ).



Con los datos anteriormente expuestos podemos concluir que RING1B, independientemente de su actividad E3 ubiquitín ligasa, es necesario para el reclutamiento de Rad9, lo que sería consistente con una activación de ATR por debajo de niveles necesarios para una estabilización y reinicio adecuados de horquillas detenidas.

### 4.3 RING1B en la proximidad del replisoma

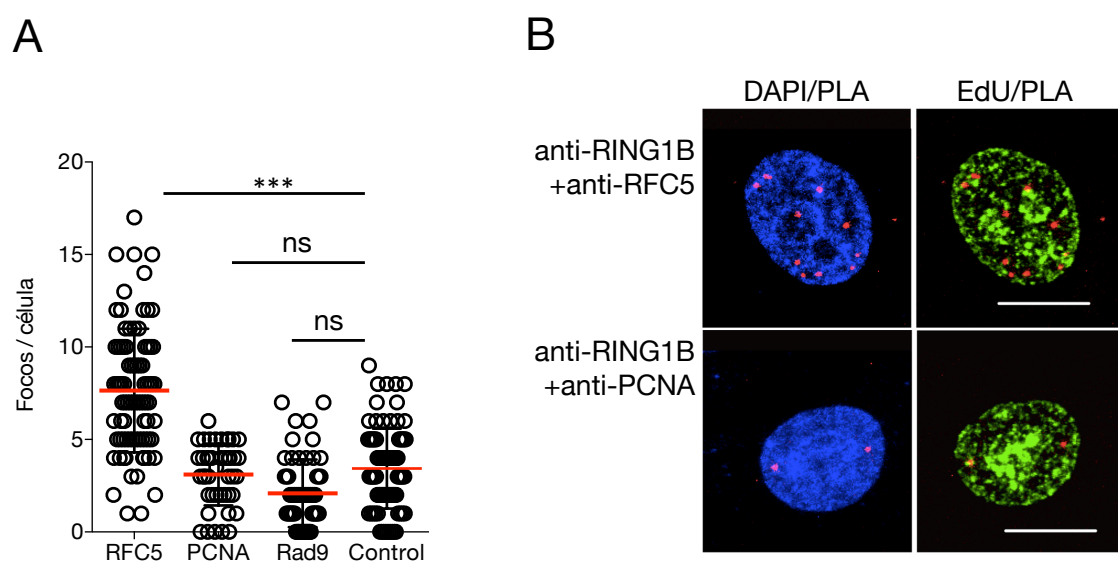
Con el fin de caracterizar la implicación de RING1B en la activación de ATR estudiamos una posible interacción con componentes de la maquinaria de replicación. Estudios previos reportaron la existencia de interacción entre RING1B y PCNA (Petruk et al.



**Figura 35.** RING1B interacciona con componentes del replisoma. Ensayos de ligación por proximidad (PLAs) en células HeLa usando las parejas de anticuerpos específicos para las proteínas RING1B y RFC5 (A) o RING1B y PCNA (B). (A) y (B) arriba: imágenes de células replicativas (EdU<sup>+</sup>) y no replicativas (EdU<sup>-</sup>) mostrando señales representativas de interacción por PLA para cada una de las parejas de anticuerpos indicadas. (A) y (B) abajo: análisis de la distribución de puntos por célula. Al menos 150 células fueron analizadas por condición en cada experimento (n=2). \*\*\*,  $p < 0.001$ . Escala 10  $\mu\text{m}$

2012; Piunti et al. 2014). Sin embargo, al tratarse de células sincitiales y transformadas respectivamente podría tratarse de una circunstancia particular. Mediante ensayos de PLA en células sin inducción de estrés replicativo, detectamos una interacción directa de RING1B y

PCNA tanto en MEFs como en células HeLa. Aunque aparecen focos de interacción en células replicativas (EdU<sup>+</sup>) y no replicativas (EdU<sup>-</sup>), el número de ellos es significativamente mayor en aquellas células que se encuentran replicando (figura 35A). Apoyando la participación de RING1B en el replisoma, al realizar el ensayo de PLA entre RING1B y RFC5, subunidad del cargador de la abrazadera de la polimerasa, obtuvimos de nuevo evidencia de proximidad entre ellos (figura 35B). De forma semejante a lo reportado para PCNA, aparecen significativamente más focos de interacción en células replicativas (figura



**Figura 36.** Interacción de RING1B con el con RFC5 en condiciones de estrés replicativo. (A) Diagrama de dispersión de puntos que muestra el número de focos resultantes del ensayo de PLA analizando la interacción de RING1B con RFC5, PCNA o Rad9 comparado con un control negativo de PLA (sólo anticuerpo contra RING1B). Las células fueron tratadas con HU durante una hora antes del experimento. (B) Imágenes representativas de los PLAs resultantes de las parejas de anticuerpos indicadas. \*\*\*,  $p < 0.001$ . Escala 10 µm

35B). Al someter a las células a un tratamiento de una hora de 4 mM HU, observamos una pérdida de la interacción observada con PCNA mientras que la de RFC5, permanece significativamente mayor al control negativo del experimento (figura 36). La pérdida de interacción con PCNA podría deberse al cambio de abrazadera como consecuencia de la activación del punto de control de fase S, por el cual PCNA se intercambia por el complejo 9-1-1. Sin embargo, al realizar un ensayo de PLA con RING1B y Rad9, no se observó un número de focos mayor que en el control negativo incluido en el experimento (figura 36). Estos datos aportan evidencia de la presencia de RING1B en el replisoma tanto en un proceso replicativo normal como en caso de la existencia de estrés replicativo.

## **DISCUSIÓN**



En este trabajo describo una implicación de las proteínas RING1A y RING1B en el proceso de replicación de DNA, al margen de su papel ampliamente estudiado en regulación transcripcional. He utilizado un modelo de estudio que permite investigar replicación sin estrés inducido, lo que, en mi opinión, distingue estos estudios de otros (Piunti et al. 2014), limitados y realizados en condiciones de estrés replicativo debido a la transformación oncogénica (Bartkova et al. 2006; Di Micco et al. 2006). Por otro lado, las nuevas funciones propuestas para las proteínas RING1 difieren de las previamente descritas en condiciones de roturas inducidas de DNA (Vissers, van Lohuizen, and Citterio 2012; Ismail et al. 2010; Pan et al. 2011; Ginjala et al. 2011). Así, he descubierto una dependencia de la ubiquitinación de H2A mediada por proteínas RING1 en la replicación de heterocromatina pericentromérica. Además, en este trabajo se describe una implicación de las proteínas RING1 en las rutas de tolerancia al estrés replicativo desconocida hasta ahora a través de funciones de RING1B tanto dependientes como independientes de su actividad E3 ligasa en los procesos de señalización y respuesta al estrés replicativo.

Los resultados, pues, extienden la función de las proteínas del grupo Polycomb más allá de su canónica función de represión transcripcional.

## **1. PARTICIPACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RING1 EN EL ESTRÉS REPLICATIVO**

### **1.1 Señalización del daño a DNA mediada por ATR**

Además de un posible daño en el DNA en condiciones fisiológicas (debido, por ejemplo a productos metabólicos), existen en el DNA barreras naturales que interfieren con su replicación provocando una parada en las horquillas. Estos obstáculos pueden ser proteínas de unión a DNA formando barreras proteicas, heterocromatina, o genes transcritos (Branzei and Foiani 2010). Esta parada puede ser transitoria o convertirse en persistente provocando la rotura de la horquilla de replicación (Bartek et al. 2004). En general, la parada de la horquilla provoca el desacoplamiento de la helicasa y la polimerasa replicativa, dando lugar a segmentos de DNA de cadena sencilla a los que se une la proteína RPA, actuando como plataforma de reclutamiento de otras proteínas, incluyendo ATR (Zou and Elledge 2003). Inmediatamente se inician modificaciones de las proteínas allí localizadas, empezando por la

fosforilación de sustratos como RPA (S33) o  $\gamma$ H2AX, lo que induce la parada del ciclo celular permitiendo la estabilización y posterior reinicio de la horquilla (Vassin et al. 2009). Un primer intento para restaurar normalidad replicativa consiste en la estabilización del replisoma y re-inicio del proceso de elongación replicativa. De no ser efectivo, la célula inicia otra vía de rescate, mediada por recombinación homóloga, utilizando como molde las roturas reguladas por nucleasas específicas (Petermann et al. 2010, Hanada et al. 2007, Segurado and Diffley 2008).

El análisis de células deficientes en proteínas RING1 muestra que las señales tempranas de respuesta a estrés replicativo y de formación roturas de DNA son más frecuentes que en células control. En ausencia de proteínas RING1, observamos un incremento en las células que presentan estrés replicativo manifestado como un aumento de RPA en zonas en las que además colocaliza con marcadores de daño a DNA. Al someter a las células a estrés replicativo exógeno mediante hidroxiurea, la fosforilación de RPA mediada por ATR, RPAS33, aparece disminuida en condiciones mutantes. De la misma manera, en estas células deficientes en proteínas RING1, observamos una reducción del patrón pan-nuclear que adquiere  $\gamma$ H2AX en respuesta a estrés replicativo de forma dependiente de ATR (Ward and Chen 2001, Liu et al. 2012). Además, en las células deficientes en RING1 observamos una tendencia a una reducción en la distancia entre orígenes indicando un mayor disparo de los mismos que en condiciones control. Este hecho podría estar de nuevo relacionado con un defecto de señalización, dado que ATR regula el disparo de orígenes de reserva (Woodward et al. 2006; Ge, Jackson, and Blow 2007; McIntosh and Blow 2012) impidiendo su activación y favoreciendo el reinicio de las horquillas paradas (Chen et al. 2015). Por tanto, basándonos en nuestras observaciones, en ausencia de proteínas RING1, se produce un aumento del estrés replicativo que, sin embargo, no induce una correcta activación de la señalización y respuesta al mismo por parte de la kinasa ATR.

¿Como podría RING1B participar en la activación de ATR? La activación de esta kinasa requiere de la proteína TopBP1, que es reclutada a cromatina a través de Rad9 (Lee, Kumagai, and Dunphy 2007; Delacroix et al. 2007). Esta proteína forma parte del complejo 9-1-1, estructuralmente relacionado con PCNA, que participa en la respuesta de daño a DNA (Eichinger and Jentsch 2011). En este trabajo, se reporta un defecto en el reclutamiento de Rad9 a cromatina en ausencia de proteínas RING1, lo que podría suponer la ausencia de

TopBP1 y por tanto, de activación de ATR (Lee, Kumagai, and Dunphy 2007; Delacroix et al. 2007). Un estudio reciente demuestra que los reclutamientos de TopBP1 y Rad9 a cromatina son independientes y que una vez reclutados, interaccionan entre ellos creando un bucle de refuerzo positivo, incrementando así la cantidad de TopBP1 en la zona dañada e induciendo la activación de ATR (Ohashi et al. 2014). Sin embargo, en este mismo estudio, especulan con la posibilidad de que, aunque el reclutamiento de uno y otro sea independiente, probablemente en ausencia de Rad9 el TopBP1 acumulado no sea suficiente para una activación completa de ATR. Aunque no detectamos interacción directa entre RING1B y Rad9, RING1B sí parece interaccionar con componentes del replisoma tanto en condiciones basales como de estrés replicativo. De hecho, en ausencia de RING1B observamos una disminución en la interacción de Rad9 con RFC5, subunidad del cargador del complejo 9-1-1. Así, se podría sugerir una función de RING1B como “plataforma molecular” facilitando la interacción entre Rad9 y RFC5, del mismo modo que Rad9 media la interacción de TopBP1 y ATR induciendo su activación (J. Lee, Kumagai, and Dunphy 2007).

El descubrimiento de la implicación de RING1B en la activación de ATR expande el conocimiento sobre la participación de las proteínas PcG en respuesta de daño a DNA. Estudios previos en células sometidas a radiaciones ionizantes y otros agentes inductores de DSB, mostraron que proteínas Polycomb, incluidas RING1A y RING1B junto con su cofactor BMI1, eran reclutados a sitios de daño a DNA actuando en reparación/señalización (Visser, van Lohuizen, and Citterio 2012). Además, reportaron una necesidad de ubiquitinación de H2AK119 para su posterior fosforilación en respuesta a daño (Ismail et al. 2010; Pan et al. 2011; Ginjala et al. 2011). Sin embargo, en este trabajo identificamos la aparición de un mayor porcentaje de células que presentan roturas  $\gamma$ H2AX/53BP1 en células deficientes en RING1B y, por tanto, de ubiquitinación de H2AK119. La aparente contradicción puede radicar en la metodología aplicada en cada caso: la irradiación de células induce daño independientemente del momento del ciclo mientras que en nuestro trabajo las roturas observadas se generan espontáneamente en células replicativas como consecuencia de la aparición de un estrés previo. Estas diferencias de metodología implican mecanismos de señalización y reparación diferentes (Smith, Tho, and Xu 2010; Abraham 2001), teniendo en cuenta que la kinasa responsable de la señalización de DSB es ATM, mientras que la que se activa mayoritariamente en condiciones de estrés replicativo es ATR (Ward and Chen 2001).

## 1.2 Estabilización y reinicio de horquillas de replicación paradas

La anemia de Fanconi (FA, Fanconi Anemia) es un síndrome de inestabilidad genómica caracterizado por fallo medular, hipersensibilidad a agentes inductores de daño a DNA y a alto riesgo de cáncer. (D'Andrea and Grompe 2003; Moldovan and D'Andrea 2009). Está causado por mutaciones en al menos 13 genes distintos, cuyos productos actúan conjuntamente en una ruta de reparación de puentes intercatenarios en el DNA. Según esta ruta de reparación canónica de FA, el complejo central, formado por las proteínas FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL y FANCM, es reclutado a la región dañada a través de la subunidad FANCM (Ciccía et al. 2007). Este complejo central tiene actividad E3 ligasa gracias a la subunidad FANCL que contiene un dominio RING, e induce la ubiquitinación del complejo formado por FANCD2-FANCI y su reclutamiento al daño (Wang 2007), donde actúa como plataforma de nucleasas que eliminan el ICL (Crossan and Patel 2012).

Sin embargo, recientemente, el ámbito funcional de FANCD2 ha sido ampliado mediante su implicación en estabilización de horquillas replicativas, de forma independiente del resto de proteínas FA (Raghunandan et al. 2015, Chen et al. 2015). Las horquillas replicativas sometidas a parada, retienen la capacidad de reinicio gracias a un mecanismo de protección mediado por RAD51, proteína implicada en la reparación del DNA por recombinación homóloga. Ante una horquilla bloqueada, RAD51 formaría un filamento de protección sobre los segmentos de DNA de cadena sencilla generados, previniendo así su corte y degradación por la nucleasa MRE11 (Petermann et al. 2010; Somyajit et al. 2015). La estabilización de este filamento de protección estaría mediada por las proteínas FANCD2 y BRCA2. Aunque la jerarquía entre estas proteínas aun está por definir, parece claro que actúan de forma epistática, de forma que tanto FANCD2 (Petermann et al. 2010) como BRCA2 (Schlacher, Wu, and Jasin 2012) estabilizarían el filamento de protección de RAD51. Sin embargo en ausencia de FANCD2, las proteínas BRCA2 y RAD51 no serían suficientes para proteger el DNA descubierto frente a nucleasas (Schlacher, Wu, and Jasin 2012). En este contexto, el incremento de roturas en células deficientes en proteínas RING1, estaría teniendo que ver con un mal funcionamiento de esta vía de estabilización de horquillas: RING1B podría facilitar el reclutamiento de FANCD2 a través de una interacción directa entre ellos, promoviendo así la estabilización del filamento de protección de RAD51 a través de BRCA2



y FANCD2. Sin embargo, en ausencia de RING1B, RAD51 no protegería el DNA de cadena sencilla, induciéndose su rotura. Además, según los datos obtenidos a través de la complementación celular con mutantes de RING1B, su participación en estabilización de horquillas a través de la unión a FANCD2 parece ser, como en el caso de la activación de ATR, independiente de su actividad E3 ligasa.

Aunque se sabe que las vías de respuesta a daño dependientes tanto de ATR como de FANCD2 participan en estabilización de horquilla y re-iniciación de replicación (Vassin et al. 2009; Murphy et al. 2014; Schlacher, Wu, and Jasin 2012; Yeo et al. 2014) su posible interrelación no es conocida. Existen estudios que relacionan la inhibición del disparo de orígenes de replicación en condiciones de estrés estaría mediado por una función de FANCD2 independiente de su canónica función en ICL y por tanto independiente de ubiquitinación (Chen et al. 2015). Esta función estaría mediada a través de una interacción de FANCD2 con la helicasa MCM de forma dependiente de ATR (Lossaint et al. 2013). En línea con esto, en condiciones de estrés replicativo, RING1B aparece unido mayoritariamente a la forma no ubiquitinada de FANCD2 apuntando de nuevo a una función de ambas proteínas en respuesta a estrés replicativo.

A la vista de los datos expuestos parece clara la afectación de las rutas de señalización y reparación del estrés replicativo en ausencia de proteínas RING1, aunque la contribución de este defecto al fallo del cultivo no está resulta. Esto es debido a la rápida upregulación del regulador de ciclo CDKN1a/p21, cuyo efecto abarca la gran mayoría de las células del cultivo, dificultando la evaluación del efecto en tolerancia al estrés. Para esclarecerlo, habría que eliminar los efectos de inhibición de entrada en fase S. Sin embargo, la eliminación de CDKN1a/p21 incrementa la inestabilidad genómica (Kreis, Louwen, and Yuan 2014) haciendo difícil separar el fenotipo debido a la deficiencia de RING1B o de CDKN1a/p21. La solución podría radicar en la existencia de un mutante de RING1B que permitiera separar los efectos de parada de ciclo celular y respuesta al estrés replicativo. Sin embargo a día de hoy, no está identificado.

## 2. PROTEÍNAS RING1 Y REPLICACIÓN

La replicación del DNA, al igual que la transcripción, ocurre en el contexto de la cromatina, donde el DNA se encuentra acomplejado a nucleosomas formados por dos copias de las cuatro histonas centrales: H2A, H2B, H3 y H4. Por tanto, la transcripción, así como la replicación y la aparición de estrés replicativo, se encuentran determinados por la integridad estructural de la cromatina.

### 2.1 Influencia del estado de la cromatina pre-existente.

Las zonas heterocromáticas son regiones de baja accesibilidad en el genoma y forman parte de las llamadas barreras naturales de la replicación. Quizá, en el caso de las regiones centroméricas y pericentroméricas es debido a su naturaleza altamente repetitiva, lo que las hace propensas a la formación de estructuras secundarias dificultando el paso de la horquilla de replicación (Branzei and Foiani 2010). Además, en regiones heterocromáticas, ricas en marcas de cromatina silenciada, existe una dependencia entre las marcas existentes y la aparición de estrés replicativo. En el caso de la trimetilación de H3K9, característica de regiones pericentroméricas (Guenatri et al. 2004), ha sido observado que la pérdida de JMJD2A, demetilasa de H3K9, provoca un incremento del estrés replicativo y un retraso en la replicación (Black et al. 2010). De la misma manera los defectos observados por la falta de JMJD2A quedan suprimidos cuando se sobreexpresa la metiltransferasa de H3K9, Suv39H, o la proteína de heterocromatina 1 (HP1 $\gamma$ ) (Black et al. 2010). De forma análoga a la necesidad de H3K9me<sub>3</sub>, en este trabajo se ha descrito un aumento de estrés replicativo como consecuencia de la falta de ubiquitinación de H2A mediada por RING1B. Hemos observado que la falta de H2AK119Ub, provoca un retraso de la replicación en regiones pericentroméricas, asociado a un aumento de la aparición de DNA de cadena sencilla. Además, el hecho de que los defectos sean restaurados tras la deposición específica de H2AK119Ub en las regiones pericentroméricas, nos permite incluir la ubiquitinación de H2A mediada por RING1B, como una marca de cromatina necesaria para el mantenimiento de un nivel basal de estrés replicativo. De hecho, la marca de histonas H3K27me<sub>3</sub> dependiente de PRC2, ha sido relacionada también con un aumento del estrés replicativo en *Tetrahymena* (S. Gao et al. 2013), aunque su función en células de mamífero no está identificada.

## 2.2 Reorganización de cromatina

Durante la replicación del DNA, los nucleosomas parentales son desensamblados por delante de la horquilla de replicación (Groth 2009), para reensamblarse tras su paso en las hebras hijas usando histonas parentales y de nueva síntesis (Groth et al. 2007, Annunziato 2005). Defectos en el reensamblaje de la cromatina durante la replicación del DNA puede conllevar defectos en la transmisión de la información epigenética y alterar la dinámica de la replicación (Groth et al. 2015).

Existen multitud de factores implicados en modificaciones de cromatina que participan en el reensamblaje y maduración de la cromatina. Entre estos factores se encuentra INO80, la subunidad ATP-asa común a la familia de remodeladores de cromatina SWI/SNF. Su mutación provoca incremento de estrés replicativo y roturas en el DNA. Además se ha visto que en su reclutamiento está implicada la ubiquitinación de H2AK119 mediada por RING1B (Lee et al. 2014). Sin embargo, el efecto que produce la ausencia de INO80 provoca un retraso general del proceso replicativo, a diferencia de la falta de RING1 que como hemos descrito en este trabajo, el defecto parece concentrado únicamente en zonas heterocromáticas. Esta restricción del efecto podría indicar un requerimiento específico de estas zonas frente a las regiones eucromáticas, en relación con su naturaleza de barrera replicativa. La presencia de RING1A y RING1B ha sido de hecho confirmada tanto en cromatina naciente como madura (Lee et al. 2014; Piunti et al. 2014; Alabert and Groth, 2012) junto con otras proteínas PcG y remodeladores de cromatina.

El hecho de que el defecto replicativo esté asociado mayoritariamente a zonas heterocromáticas podría estar relacionado también con lo reportado recientemente sobre el modo en que se incorpora H2A en la replicación (Boyarchuk et al. 2014). En este estudio se demuestra que, mientras la incorporación de nueva H2A en eucromatina se produce a lo largo de todo el ciclo celular, la incorporación en PHC es estrictamente dependiente de replicación (Boyarchuk et al. 2014). Por tanto, la ubiquitinación de H2AK119 podría ser un requisito previo para su incorporación como marca pre-deposición. Tal es el caso, por ejemplo, de lo que ocurre con la modificación H3K9me3 (Loyola et al. 2009) que debe incorporarse como H3K9me2 para su posterior trimetilación. En el caso de H2B, su ubiquitinación ha sido relacionada con estabilización y reensamblaje de nucleosomas tras la replicación, afectando

por tanto la velocidad del proceso (Trujillo and Osley 2012; Lin et al. 2014). Aunque estos datos provienen de estudios en levaduras, la eliminación de la E3 ubiquitín ligasa de H2B en mamíferos, RNF20/40 resulta en la aparición de estrés replicativo y roturas en el DNA (Chernikova et al. 2012), de forma similar a lo que muestran los datos aportados en este trabajo en ausencia de las E3 ligasas de H2A, RING1A y RING1B.

La replicación y la transcripción tienen como sustrato el DNA, por lo que ambas rutas pueden interferir entre si (Helmrich et al. 2013). Por tanto, el estrés replicativo observado podría deberse a un aumento de la transcripción de las secuencias satélites debido a la falta de represión mediada por H2AK119Ub, causando interferencias entre las maquinarias de replicación y transcripción (Helmrich et al. 2013). De hecho, en células deficientes en la E3 ligasa BRCA1 (Zhu et al. 2011) se ha visto upregulación de satélites asociado a pérdida de ubiquitinación de H2A. Sin embargo, estudios recientes demostraron que los sustratos de BRCA1 son las lisinas 127 y 129 de H2A, no la lisina 119 como es el caso de RING1B (Kalb, Mallery, et al. 2014). Por otro lado, no se observa upregulación de satélites en células deficientes únicamente en RING1B (Zhu et al. 2011) lo que sería consistente con una represión de satélites mediada mayoritariamente a través de mecanismos de metilación de H3K9 y del DNA (Sharif et al. 2007; Bulut-Karslioglu et al. 2012). Además, la desrepresión de satélites no lleva asociada un defecto de proliferación ni de incremento de la respuesta de daño a DNA (Bulut-Karslioglu et al. 2012), por lo que podemos descartar la interferencia replicación-transcripción como fuente del estrés replicativo en PHC en células deficientes en las proteínas RING1.

### **3. INESTABILIDAD GENÓMICA, TRANSFORMACIÓN CELULAR Y RING1B**

El estrés replicativo puede inducir la aparición de puentes anafásicos, provocando errores en la segregación cromosómica e inestabilidad genómica como consecuencia de la división celular (Wilhelm et al. 2014, Naim and Rosselli 2009). En este estudio hemos descrito un defecto mitótico en células deficientes en proteínas RING1, por el cual aparece un elevado porcentaje de puentes nucleoplásmicos en anafase acompañado de un aumento del número de micronúcleos por célula. Este tipo de aberraciones mitóticas están relacionadas con la segregación a polos opuestos de cromosomas dicéntricos durante la mitosis. Así, al

finalizar la telofase, los nuevos núcleos y el puente de DNA entre ellos queda rodeado de membrana. Al terminar la citocinesis el puente nucleoplásmico se rompería originando los micronúcleos (Savage 1988; Fenech et al. 2011; Thomas and Fenech 2011). Ha sido descrito, que uno de los orígenes posibles de los cromosomas dicéntricos sería la falta de proteínas de recombinación homóloga, como RAD51 (Lahkim Bennani-Belhaj et al. 2010; Laulier, Cheng, and Stark 2011; Rodrigue et al. 2013). Esto favorecería la reparación de la rotura formada la unión de extremos no homólogos, (NHEJ, non homologous end joining) método de reparación propenso a errores, dando origen a cromosomas dicéntricos cuya división en mitosis generaría los puentes nucleoplásmicos (Adamo et al. 2010).

Este tipo de estructuras anafásicas ha sido visto en células deficientes en FANCD2. De hecho, el mecanismo de reinicio de horquillas dependiente de FANCD2 parece pasar por un proceso de recombinación homóloga ya que existen evidencias que implican a FANCD2 en coordinar proteínas claves de esta ruta de reparación mediando la protección de las horquillas y permitiendo su correcto reinicio posterior: además del ya citado caso de la proteína RAD51 (Schlachter, Wu, and Jasin 2012), la proteína CtIP, aun teniendo funciones dependientes e independientes de FANCD2, su reclutamiento a horquillas paradas es estrictamente dependiente de FANCD2 (Yeo et al. 2014). De hecho, la supresión de la vía de NHEJ en mutantes de FANCD2 elimina los defectos mitóticos presentes en estas células, lo que es consistente con la idea de la existencia de reordenamientos cromosómicos mediante NHEJ (Adamo et al. 2010). Poniendo en este contexto nuestras observaciones, la aparición de las aberraciones mitóticas en células deficientes en RING1A y RING1B podría deberse a un defecto de recombinación homóloga debido a un reclutamiento ineficiente de FANCD2. De esta manera, las lesiones no serían reparadas por recombinación homóloga, sino mediante NHEJ generando estructuras cromosomales aberrantes, cuya división en mitosis daría lugar a puentes nucleoplásmicos observados en células deficientes en proteínas RING1.

El fallo de segregación durante la mitosis puede provocar roturas cromosómicas, dando lugar a ciclos de rotura/fusión frecuentemente encontrados en células cancerígenas (Gisselsson et al. 2000). Las células tumorales están expuestas de modo continuo a estrés replicativo mediado por oncogenes. En el caso de la activación del proto-oncogén MYC, resulta en una fase inicial de hiperproliferación acompañada de una replicación y disparo de orígenes excesivos (Di Micco et al. 2006, Bartkova et al. 2006). Cuando el estrés replicativo

está acoplado a un fallo en las rutas de control, resulta en un escape de la senescencia inducida por oncogenes. Asimismo, el prolongado estrés replicativo provoca la inestabilidad genómica de los genomas tumorales (Zheng et al. 2012) por lo que al mismo tiempo son necesarias mutaciones compensatorias para evitar la entrada de las células en catástrofe mitótica (Jackson, Bartek 2006). La participación de RING1B en las rutas de reparación y tolerancia al estrés replicativo podría entonces tener que ver con su sobreexpresión en tumores (Sanchez-Beato et al 2004 y 2006, Dukers et al. 2004, van Leenders et al. 2007). Así, tumores que sobreexpresan RING1B podrían tener aumentadas las rutas de estabilización de horquillas replicativas a través del reclutamiento de proteínas específicas de la vía como FANCD2, contribuyendo a la robustez de las células tumorales. Se han descrito casos similares, como el de sobreexpresión de RAD51 en distintos tipos de tumores (Raderschall, Stout, et al. 2002; Brown and Holt 2009), donde podría actuar formando un filamento de estabilización más estable (Raderschall, Bazarov, et al. 2002) aún en ausencia de FancD2 (Schlachter Wu and Jasin 2012).

Sin embargo, en caso de ausencia de RING1B, el aumento continuo de disparo de orígenes en las regiones heterocromáticas podría estar sometiendo a las células a un estrés replicativo crónico debido a la falta de ubiquitinación en heterocromatina. Este hecho, sumado a un defecto de la respuesta de daño a DNA, exacerbaría la inestabilidad genómica causada por el estrés replicativo (Aguilera and García-Muse 2013, Moldovan and D'Andrea 2009) predisponiendo a las células a la adquisición de una segunda mutación compensatoria permitiendo la transformación tumoral.

## **CONCLUSIONES**





1. La ausencia de proteínas RING1 produce un drástico arresto proliferativo como consecuencia de una upregulación de CDKN1a/p21 en fibroblastos embrionarios de ratón
2. RING1 contribuye al proceso replicativo a través de funciones tanto dependientes como independientes de su actividad E3 ligasa.
3. La falta de RING1 provoca un retraso durante la replicación de heterocromatina aumentando el estrés replicativo en estas zonas, de forma dependiente de su actividad E3 ligasa.
4. Existe una ineficiente respuesta al daño por estrés replicativo mediado por la kinasa ATR en ausencia de proteínas RING1
5. En ausencia de RING1 se observa un comportamiento anómalo de la ruta de estabilización de horquillas mediada por FANCD2-BRCA2-RAD51.
6. RING1B interacciona tanto con componentes del replisoma como la proteína de estabilización FANCD2



## **BIBLIOGRAFÍA**



Abraham, Robert T. 2001. "Cell Cycle Checkpoint Signaling Through the ATM and ATR Kinases.pdf." *Genes & Development* 15: 2177–96. doi:10.1101/gad.914401.DNA.

Adamo, Adele, Spencer J. Collis, Carrie A. Adelman, Nicola Silva, Zuzana Horejsi, Jordan D. Ward, Enrique Martinez-Perez, Simon J. Boulton, and Adriana La Volpe. 2010. "Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia." *Molecular Cell* 39 (1): 25–35. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.026.

Aguilera, Andrés, and Tatiana García-Muse. 2013. "Causes of Genome Instability." *Annual Review of Genetics* 47 (October): 1–32. doi:10.1146/annurev-genet-111212-133232.

Alabert, Constance, Jimi-Carlo Bukowski-Wills, Sung-Bau Lee, Georg Kustatscher, Kyosuke Nakamura, Flavia de Lima Alves, Patrice Menard, Jakob Mejlvang, Juri Rappsilber, and Anja Groth. 2014. "Nascent Chromatin Capture Proteomics Determines Chromatin Dynamics during DNA Replication and Identifies Unknown Fork Components." *Nature Cell Biology* 16 (3): 281–93. doi:10.1038/ncb2918.

Alchanati, Iris, Carmit Teicher, Galit Cohen, Vivian Shemesh, Haim M Barr, Philippe Nakache, Danny Ben-Avraham, et al. 2009. "The E3 Ubiquitin-Ligase Bmi1/Ring1A Controls the Proteasomal Degradation of Top2alpha Cleavage Complex - a Potentially New Drug Target." *PloS One* 4 (12): e8104. doi:10.1371/journal.pone.0008104.

Annunziato, A. T. 2005. "Split Decision: What Happens to Nucleosomes during DNA Replication?" *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 12065–68. doi:10.1074/jbc.R400039200.

Aranda, Sergi, Gloria Mas, and Luciano Di Croce. 2015. "Regulation of Gene Transcription by Polycomb Proteins." *Science Advances* 1 (December): 1–16. doi:10.1126/sciadv.1500737.

Azuara, Véronique, Pascale Perry, Stephan Sauer, Mikhail Spivakov, Helle F Jørgensen, Rosalind M John, Mina Gouti, et al. 2006. "Chromatin Signatures of Pluripotent Cell Lines." *Nature Cell Biology* 8 (5): 532–38. doi:10.1038/ncb1403.

Balajee, Adayabalam S., and Charles R. Geard. 2004. "Replication Protein a and  $\gamma$ H2AX Foci Assembly Is Triggered by Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks." *Experimental Cell Research* 300 (2): 320–34. doi:10.1016/j.yexcr.2004.07.022.

Bantignies, Frédéric, and Giacomo Cavalli. 2011. "Polycomb Group Proteins: Repression in 3D." *Trends in Genetics : TIG* 27 (11): 454–64. doi:10.1016/j.tig.2011.06.008.

Bantignies, Frédéric, Virginie Roure, Itys Comet, Benjamin Leblanc, Bernd Schuettengruber, Jérôme Bonnet, Vanessa Tixier, André Mas, and Giacomo Cavalli. 2011.

“Polycomb-Dependent Regulatory Contacts between Distant Hox Loci in *Drosophila*.” *Cell* 144 (2): 214–26. doi:10.1016/j.cell.2010.12.026.

Bartek Jiri, Lukas Claudia, Lukas Jiri. 2004. Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(10):792–804. doi:10.1038/nrm1493

Bartkova, Jirina, Nousin Rezaei, Michalis Lontos, Panagiotis Karakaidos, Dimitris Kletsas, Natalia Issaeva, Leandros-Vassilios F Vassiliou, et al. 2006. “Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints.” *Nature* 444 (7119): 633–37. doi:10.1038/nature05268.

Ben-Saadon, Ronen, Daphna Zaaroor, Tamar Ziv, and Aaron Ciechanover. 2006. “The Polycomb Protein Ring1B Generates Self Atypical Mixed Ubiquitin Chains Required for Its In Vitro Histone H2A Ligase Activity.” *Molecular Cell* 24 (5): 701–11. doi:10.1016/j.molcel.2006.10.022.

Bergink, Steven, Florian a. Salomons, Deborah Hoogstraten, Tom a M Groothuis, Harm De Waard, Junxin Wu, Li Yuan, et al. 2006. “DNA Damage Triggers Nucleotide Excision Repair-Dependent Monoubiquitylation of Histone H2A.” *Genes and Development* 20 (10): 1343–52. doi:10.1101/gad.373706.

Bernstein, Bradley E., Tarjei S. Mikkelsen, Xiaohui Xie, Michael Kamal, Dana J. Huebert, James Cuff, Ben Fry, et al. 2006. “A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells.” *Cell* 125 (2): 315–26. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041.

Bernstein, Emily, Elizabeth M Duncan, Osamu Masui, Jesus Gil, Edith Heard, and C David Allis. 2006. “Mouse Polycomb Proteins Bind Differentially to Methylated Histone H3 and RNA and Are Enriched in Facultative Heterochromatin.” *Molecular and Cellular Biology* 26 (7): 2560–69. doi:10.1128/MCB.26.7.2560-2569.2006.

Bianchi, V., E. Pontis, and P. Reichard. 1986. “Changes of Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools Induced by Hydroxyurea and Their Relation to DNA Synthesis.” *Journal of Biological Chemistry* 261 (34): 16037–42.

Black, Joshua C., Andrew Allen, Capucine Van Rechem, Emily Forbes, Michelle Longworth, Katrin Tschöp, Claire Rinehart, et al. 2010. “Conserved Antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 $\gamma$  during Cell Cycle Progression.” *Molecular Cell* 40 (5): 736–48. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.008.

Blackledge, Neil P., Anca M. Farcas, Takashi Kondo, Hamish W. King, Joanna F. McGouran, Lars L P Hanssen, Shinsuke Ito, et al. 2014. “Variant PRC1 Complex-Dependent

H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation.” *Cell* 157 (6): 1445–59. doi:10.1016/j.cell.2014.05.004.

Borden, Katherine L B. 2000. “RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds?” *Journal of Molecular Biology* 295 (5): 1103–12. doi:10.1006/jmbi.1999.3429.

Boyarchuk, Ekaterina, Dan Filipescu, Isabelle Vassias, Sylvain Cantaloube, and Geneviève Almouzni. 2014. “Pericentric Heterochromatin State during the Cell Cycle Controls the Histone Variant Composition of Centromeres.” *Journal of Cell Science*, 3347–59. doi:10.1242/jcs.148189.

Boyer, Laurie a, Kathrin Plath, Julia Zeitlinger, Tobias Brambrink, Lea a Medeiros, Tong Ihn Lee, Stuart S Levine, et al. 2006. “Polycomb Complexes Repress Developmental Regulators in Murine Embryonic Stem Cells.” *Nature* 441 (7091): 349–53. doi:10.1038/nature04733.

Bracken, Adrian P, Daniela Kleine-kohlbrecher, Nikolaj Dietrich, Diego Pasini, Gaetano Gargiulo, Kim Theilgaard-mönch, Saverio Minucci, et al. 2007. “The Polycomb Group Proteins Bind throughout the INK4A-ARF Locus and Are Disassociated in Senescent Cells Service The Polycomb Group Proteins Bind throughout the INK4A-ARF Locus and Are Disassociated in Senescent Cells.” *Genes & Development*, 525–30. doi:10.1101/gad.415507.

Branzei, Dana, and Marco Foiani. 2010. “Maintaining Genome Stability at the Replication Fork.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (3): 208–19. doi:10.1038/nrm2852.

Breinbauer, Rolf, and Maja Köhn. 2003. “Azide-Alkyne Coupling: A Powerful Reaction for Bioconjugate Chemistry.” *ChemBioChem* 4 (11): 1147–49. doi:10.1002/cbic.200300705.

Brown, Erika T., and Jeffrey T. Holt. 2009. “Rad51 Overexpression Rescues Radiation Resistance in BRCA2-Defective Cancer Cells.” *Molecular Carcinogenesis* 48 (2): 105–9. doi:10.1002/mc.20463.

Buchwald, Gretel, Petra van der Stoop, Oliver Weichenrieder, Anastassis Perrakis, Maarten van Lohuizen, and Titia K Sixma. 2006. “Structure and E3-Ligase Activity of the Ring-Ring Complex of Polycomb Proteins Bmi1 and Ring1b.” *The EMBO Journal* 25 (11): 2465–74. doi:10.1038/sj.emboj.7601144.

Budzowska, Magda, Iris Jaspers, Jeroen Essers, Harm de Waard, Ellen van Drunen, Katsuhiko Hanada, Berna Beverloo, et al. 2004. “Mutation of the Mouse Rad17 Gene Leads

to Embryonic Lethality and Reveals a Role in DNA Damage-Dependent Recombination.” *The EMBO Journal* 23 (17): 3548–58. doi:10.1038/sj.emboj.7600353.

Buisson, Rémi, Joshi Niraj, Joris Pauty, Ranjan Maity, Weixing Zhao, Yan Coulombe, Patrick Sung, and Jean-Yves Masson. 2014. “Breast Cancer Proteins PALB2 and BRCA2 Stimulate Polymerase  $\eta$  in Recombination-Associated DNA Synthesis at Blocked Replication Forks.” *Cell Reports* 6 (3): 553–64. doi:10.1016/j.celrep.2014.01.009.

Bulut-Karslioglu, Aydan, Valentina Perrera, Manuela Scaranaro, Inti Alberto de la Rosa-Velazquez, Suzanne van de Nobelen, Nicholas Shukeir, Johannes Popow, et al. 2012. “A Transcription Factor-based Mechanism for Mouse Heterochromatin Formation.” *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (10): 1023–30. doi:10.1038/nsmb.2382.

Buonomo, Sara B C, Yipin Wu, David Ferguson, and Titia De Lange. 2009. “Mammalian Rif1 Contributes to Replication Stress Survival and Homology-Directed Repair.” *Journal of Cell Biology* 187 (3): 385–98. doi:10.1083/jcb.200902039.

Byun, Tony S., Marcin Pacek, Muh Ching Yee, Johannes C. Walter, and Karlene a. Cimprich. 2005. “Functional Uncoupling of MCM Helicase and DNA Polymerase Activities Activates the ATR-Dependent Checkpoint.” *Genes and Development* 19 (9): 1040–52. doi:10.1101/gad.1301205.

Calés, Carmela, Mónica Román-Trufero, Leticia Pavón, Iván Serrano, Teresa Melgar, Mitsuhiro Endoh, Claudia Pérez, Haruhiko Koseki, and Miguel Vidal. 2008. “Inactivation of the Polycomb Group Protein Ring1B Unveils an Antiproliferative Role in Hematopoietic Cell Expansion and Cooperation with Tumorigenesis Associated with Ink4a Deletion.” *Molecular and Cellular Biology* 28 (3): 1018–28. doi:10.1128/MCB.01136-07.

Cao, Ru, Yu-Ichi Tsukada, and Yi Zhang. 2005. “Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A Ubiquitylation and Hox Gene Silencing.” *Molecular Cell* 20 (6): 845–54. doi:10.1016/j.molcel.2005.12.002.

Chan, C. S., Rastelli, L. and Pirrotta, V 1994. “A polycomb response element in the Ubx gene that determines an epigenetically inherited state of repression.” *EMBO Journal* 13:, 2533-2564

Chandler, Hollie, Harshil Patel, Richard Palermo, Sharon Brookes, Nik Matthews, and Gordon Peters. 2014. “Role of Polycomb Group Proteins in the DNA Damage Response - A Reassessment.” *PloS One* 9 (7): e102968. doi:10.1371/journal.pone.0102968.



Chen, X, L Bosques, P Sung, and G M Kupfer. 2015. “A Novel Role for Non-Ubiquitinated FANCD2 in Response to Hydroxyurea-Induced DNA Damage.” *Oncogene*, n°. August 2014: 1–13. doi:10.1038/onc.2015.68.

Chernikova, Sophia B., Olga V. Razorenova, John P. Higgins, Brock J. Sishc, Monica Nicolau, Jennifer A. Dorth, Diana A. Chernikova, et al. 2012. “Deficiency in Mammalian Histone H2B Ubiquitin Ligase Bre1 (Rnf20/Rnf40) Leads to Replication Stress and Chromosomal Instability.” *Cancer Research* 72 (8): 2111–19. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2209.

Chou, Danny M, Britt Adamson, Noah E Dephoure, Xu Tan, Amanda C Nottke, Kristen E Hurov, Steven P Gygi, Monica P Colaiácovo, and Stephen J Elledge. 2010. “A Chromatin Localization Screen Reveals Poly (ADP Ribose)-Regulated Recruitment of the Repressive Polycomb and NuRD Complexes to Sites of DNA Damage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (43): 18475–80. doi:10.1073/pnas.1012946107.

Ciccia, Alberto, Chen Ling, Rachel Coulthard, Zhijiang Yan, Yutong Xue, Amom Ruhikanta Meetei, El Houari Laghmani, et al. 2007. “Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein That Interacts with FANCM.” *Molecular Cell* 25 (3): 331–43. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.003.

Cmarko, Dusan, Pernette J Verschure, Arie P Otte, Roel van Driel, and Stanislav Fakan. 2003. “Polycomb Group Gene Silencing Proteins Are Concentrated in the Perichromatin Compartment of the Mammalian Nucleus.” *Journal of Cell Science* 116: 335–43. doi:10.1242/jcs.00225.

Cooper, Sarah, Martin Dienstbier, Raihann Hassan, Lothar Schermelleh, Jafar Sharif, NeilP Blackledge, Valeria DeMarco, et al. 2014. “Targeting Polycomb to Pericentric Heterochromatin in Embryonic Stem Cells Reveals a Role for H2AK119u1 in PRC2 Recruitment.” *Cell Reports* 7: 1456–70. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.012.

Core, Leighton J., Joshua J. Waterfall, Daniel A. Gilchrist, David C. Fargo, Hojoong Kwak, Karen Adelman, and John T. Lis. 2012. “Defining the Status of RNA Polymerase at Promoters.” *Cell Reports* 2 (4): 1025–35. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.034.

Crossan, Gerry P., and Ketan J. Patel. 2012. “The Fanconi Anaemia Pathway Orchestrates Incisions at Sites of Crosslinked DNA.” *Journal of Pathology* 226 (2): 326–37. doi:10.1002/path.3002.

Cui, Kairong, Chongzhi Zang, Tae Young Roh, Dustin E. Schones, Richard W. Childs, Weiqun Peng, and Keji Zhao. 2009. “Chromatin Signatures in Multipotent Human

Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation.” *Cell Stem Cell* 4 (1): 80–93. doi:10.1016/j.stem.2008.11.011.

del Mar Lorente, M, C Marcos-Gutiérrez, C Pérez, J Schoorlemmer, a Ramírez, T Magin, and M Vidal. 2000. “Loss- and Gain-of-Function Mutations Show a Polycomb Group Function for Ring1A in Mice.” *Development (Cambridge, England)* 127 (23): 5093–5100.

D’Andrea, Alan D, and Markus Grompe. 2003. “The Fanconi anaemia/BRCA pathway.” *Nature Reviews Cancer* 3, 23–34. doi:10.1038/nrc970

Delacroix, Sinny, Jill M. Wagner, Masahiko Kobayashi, Ken Ichi Yamamoto, and Larry M. Karnitz. 2007. “The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) Clamp Activates Checkpoint Signaling via TopBP1.” *Genes and Development* 21 (12): 1472–77. doi:10.1101/gad.1547007.

Dellino, Gaetano I., Yuri B. Schwartz, Gabriella Farkas, Donna McCabe, S. C R Elgin, and Vincenzo Pirrotta. 2004. “Polycomb Silencing Blocks Transcription Initiation.” *Molecular Cell* 13 (6): 887–93. doi:10.1016/S1097-2765(04)00128-5.

Di Croce, Luciano, and Kristian Helin. 2013. “Transcriptional Regulation by Polycomb Group Proteins.” *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (10): 1147–55. doi:10.1038/nsmb.2669.

Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, et al. 2006. “Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication.” *Nature* 444 (7119): 638–42. doi:10.1038/nature05327.

Doil, Carsten, Niels Mailand, Simon Bekker-Jensen, Patrice Menard, Dorthe Helena Larsen, Rainer Pepperkok, Jan Ellenberg, et al. 2009. “RNF168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins.” *Cell* 136 (3): 435–46. doi:10.1016/j.cell.2008.12.041.

Dukers, Danny F, Joost C van Galen, Cindy Giroth, Patty Jansen, Richard G A B Sewalt, Arie P Otte, Hanneke C Kluin-Nelemans, Chris J L M Meijer, and Frank M Raaphorst. 2004. “Unique Polycomb Gene Expression Pattern in Hodgkin’s Lymphoma and Hodgkin's Lymphoma-Derived Cell Lines.” *The American Journal of Pathology* 164 (3): 873–81. doi:10.1016/S0002-9440(10)63175-6.

Duncan,I.M. 1982 “Polycomblake: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*.” *Genetics* 102: 49–70.

Eichinger, Christian S., and Stefan Jentsch. 2011. “9-1-1: PCNA’s Specialized Cousin.” *Trends in Biochemical Sciences* 36 (11): 563–68. doi:10.1016/j.tibs.2011.08.002.

Endoh, Mitsuhiro, Takaho A Endo, Tamie Endoh, Yu-ichi Fujimura, Osamu Ohara, Tetsuro Toyoda, Arie P Otte, et al. 2008. “Polycomb Group Proteins Ring1A/B Are Functionally Linked to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry to Maintain ES Cell Identity.” *Development (Cambridge, England)* 135 (8): 1513–24. doi:10.1242/dev.014340.

Endoh, Mitsuhiro, Takaho a. Endo, Tamie Endoh, Kyo Ichi Isono, Jafar Sharif, Osamu Ohara, Tetsuro Toyoda, et al. 2012. “Histone H2A Mono-Ubiquitination Is a Crucial Step to Mediate PRC1-Dependent Repression of Developmental Genes to Maintain ES Cell Identity.” *PLoS Genetics* 8 (7): 1–10. doi:10.1371/journal.pgen.1002774.

Eskeland, Ragnhild, Martin Leeb, Graeme R. Grimes, Clémence Kress, Shelagh Boyle, Duncan Sproul, Nick Gilbert, et al. 2010. “Ring1B Compacts Chromatin Structure and Represses Gene Expression Independent of Histone Ubiquitination.” *Molecular Cell* 38 (3): 452–64. doi:10.1016/j.molcel.2010.02.032.

Fang, Jia, Taiping Chen, Brian Chadwick, En Li, and Yi Zhang. 2004. “Ring1b-Mediated H2A Ubiquitination Associates with Inactive X Chromosomes and Is Involved in Initiation of X Inactivation.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 52812–15. doi:10.1074/jbc.C400493200.

Farcas, Anca M., Neil P. Blackledge, Ian Sudbery, Hannah K. Long, Joanna F. McGouran, Nathan R. Rose, Sheena Lee, et al. 2012. “KDM2B Links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to Recognition of CpG Islands.” *eLife* 2012 (1): 1–26. doi:10.7554/eLife.00205.

Fasano, Christopher a., John T. Dimos, Natalia B. Ivanova, Natalia Lowry, Ihor R. Lemischka, and Sally Temple. 2007. “shRNA Knockdown of Bmi-1 Reveals a Critical Role for p21-Rb Pathway in NSC Self-Renewal during Development.” *Cell Stem Cell* 1 (1): 87–99. doi:10.1016/j.stem.2007.04.001.

Fenech, M., M. Kirsch-Volders, a. T. Natarajan, J. Surralles, J. W. Crott, J. Parry, H. Norppa, D. a. Eastmond, J. D. Tucker, and P. Thomas. 2011. “Molecular Mechanisms of Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge and Nuclear Bud Formation in Mammalian and Human Cells.” *Mutagenesis* 26 (1): 125–32. doi:10.1093/mutage/geq052.

Fischle, Wolfgang, Yanming Wang, and C David Allis. 2003. “Binary Switches and Modification Cassettes in Histone Biology and Beyond.” *Nature* 425 (6957): 475–79. doi:10.1038/nature02017.

Francis, Nicole J., Andrew J. Saurin, Zhaohui Shao, and Robert E. Kingston. 2001. "Reconstitution of a Functional Core Polycomb Repressive Complex." *Molecular Cell* 8 (3): 545–56. doi:10.1016/S1097-2765(01)00316-1.

Fritsch, Cornelia, Dirk Beuchle, and Jürg Müller. 2003. "Molecular and Genetic Analysis of the Polycomb Group Gene Sex Combs extra/Ring in Drosophila." *Mechanisms of Development* 120 (8): 949–54. doi:10.1016/S0925-4773(03)00083-2.

Gao, Shan, Jie Xiong, Chunchao Zhang, Brian R. Berquist, Rendong Yang, Meng Zhao, Anthony J. Molascon, et al. 2013. "Impaired Replication Elongation in Tetrahymena Mutants Deficient in Histone H3 Lys 27 Monomethylation." *Genes and Development* 27 (15): 1662–79. doi:10.1101/gad.218966.113.

Gao, Zhonghua, Jin Zhang, Roberto Bonasio, Francesco Strino, Ayana Sawai, Fabio Parisi, Yuval Kluger, and Danny Reinberg. 2012. "PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes." *Molecular Cell* 45 (3): 344–56. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.002.

Garcia, Emiliano, Camelia Marcos-Gutiérrez, Maria Del Mar Lorente, Juan Carlos Moreno, and Miguel Vidal. 1999. "RYBP, a New Repressor Protein That Interacts with Components of the Mammalian Polycomb Complex, and with the Transcription Factor YY1." *EMBO Journal* 18 (12): 3404–18. doi:10.1093/emboj/18.12.3404.

Ge, Xin Quan, Dean A. Jackson, and J. Julian Blow. 2007. "Dormant Origins Licensed by Excess Mcm2-7 Are Required for Human Cells to Survive Replicative Stress." *Genes and Development* 21 (24): 3331–41. doi:10.1101/gad.457807.

Gearhart, Micah D, Connie M Corcoran, Joseph A Wamstad, and Vivian J Bardwell. 2006. "Polycomb Group and SCF Ubiquitin Ligases Are Found in a Novel BCOR Complex That Is Recruited to BCL6 Targets." *Molecular and Cellular Biology* 26 (18): 6880–89. doi:10.1128/MCB.00630-06.

Glinsky, G.V., Berezovska, O. and Glinskii, A.B. (2005). "Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer." *Journal of Clinical Investigation* 115: 1503-1521

Gil, Jesús, and Gordon Peters. 2006. "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a Tumour Suppressor Locus: All for One or One for All." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (9): 667–77. doi:10.1038/nrm1987.

Ginjala, V., K. Nacerddine, A. Kulkarni, J. Oza, S. J. Hill, M. Yao, E. Citterio, M. van Lohuizen, and S. Ganesan. 2011. "BMI1 Is Recruited to DNA Breaks and Contributes to

DNA Damage-Induced H2A Ubiquitination and Repair.” *Molecular and Cellular Biology* 31 (10): 1972–82. doi:10.1128/MCB.00981-10.

Gisselsson, D, L Pettersson, M Höglund, M Heidenblad, L Gorunova, J Wiegant, F Mertens, P Dal Cin, F Mitelman, and N Mandahl. 2000. “Chromosomal Breakage-Fusion-Bridge Events Cause Genetic Intratumor Heterogeneity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5357–62. doi:10.1073/pnas.090013497.

Gorfinkiel, Nicole, Laura Fanti, Teresa Melgar, Emiliano García, Sergio Pimpinelli, Isabel Guerrero, and Miguel Vidal. 2004. “The Drosophila Polycomb Group Gene Sex Combs Extra Encodes the Ortholog of Mammalian Ring1 Proteins.” *Mechanisms of Development* 121 (5): 449–62. doi:10.1016/j.mod.2004.03.019.

Groth, Anja, Armelle Corpet, Adam J L Cook, Daniele Roche, Jiri Bartek, Jiri Lukas, and Geneviève Almouzni. 2007. “Regulation of Replication Fork Progression through Histone Supply and Demand.” *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1928–31. doi:10.1126/science.1148992.

Gu, Yue, Amanda E. Jones, Wei Yang, Shanrun Liu, Qian Dai, Yudong Liu, C. Scott Swindle, et al. 2015. “The Histone H2A Deubiquitinase Usp16 Regulates Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Function.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201517041. doi:10.1073/pnas.1517041113

Guenatri, Mounia, Delphine Bailly, Christèle Maison, and Geneviève Almouzni. 2004. “Mouse Centric and Pericentric Satellite Repeats Form Distinct Functional Heterochromatin.” *Journal of Cell Biology* 166 (4): 493–505. doi:10.1083/jcb.200403109.

Hanada, Katsuhiko, Magda Budzowska, Sally L Davies, Ellen van Drunen, Hideo Onizawa, H Berna Beverloo, Alex Maas, Jeroen Essers, Ian D Hickson, and Roland Kanaar. 2007. “The Structure-Specific Endonuclease Mus81 Contributes to Replication Restart by Generating Double-Strand DNA Breaks.” *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1096–1104. doi:10.1038/nsmb1313.

Hansen, Klaus H, Adrian P Bracken, Diego Pasini, Nikolaj Dietrich, Simmi S Gehani, Astrid Monrad, Juri Rappsilber, Mads Lerdrup, and Kristian Helin. 2008. “A Model for Transmission of the H3K27me3 Epigenetic Mark.” *Nature Cell Biology* 10 (11): 1291–1300. doi:10.1038/ncb1787.

Hanson, I M, a Poustka, and J Trowsdale. 1991. “New Genes in the Class II Region of the Human Major Histocompatibility Complex.” *Genomics* 10 (2): 417–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8260845>.

Hashimoto, Yoshitami, Arnab Ray Chaudhuri, and Massimo Lopes. 2015. "Rad51 Protects Nascent DNA from Mre11 Dependent Degradation and Promotes Continuous DNA Synthesis" 17 (11): 1305–11. doi:10.1038/nsmb.1927.Rad51.

He, Jin, Li Shen, Ma Wan, Olena Taranova, Hao Wu, and Yi Zhang. 2013. "Kdm2b Maintains Murine Embryonic Stem Cell Status by Recruiting PRC1 Complex to CpG Islands of Developmental Genes." *Nature Cell Biology* 15 (4): 373–84. doi:10.1038/ncb2702.

Helmrich, Anne, Monica Ballarino, Evgeny Nudler, and Laszlo Tora. 2013. "Transcription-Replication Encounters, Consequences and Genomic Instability." *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (4): 412–18. doi:10.1038/nsmb.2543.

Howlett, N. G. 2005. "The Fanconi Anemia Pathway Is Required for the DNA Replication Stress Response and for the Regulation of Common Fragile Site Stability." *Human Molecular Genetics* 14 (5): 693–701. doi:10.1093/hmg/ddi065.

Hussain, S. 2004. "Direct Interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA Damage Response Pathways." *Human Molecular Genetics* 13 (12): 1241–48. doi:10.1093/hmg/ddh135.

Ismail, Hassan, Christi Andrin, Darin McDonald, and Michael J. Hendzel. 2010. "BMI1-Mediated Histone Ubiquitylation Promotes DNA Double-Strand Break Repair." *Journal of Cell Biology* 191 (1): 45–60. doi:10.1083/jcb.201003034.

Isono, Kyoichi, Takaho A Endo, Manching Ku, Daisuke Yamada, Rie Suzuki, Jafar Sharif, Tomoyuki Ishikura, Tetsuro Toyoda, Bradley E Bernstein, and Haruhiko Koseki. 2013. "SAM Domain Polymerization Links Subnuclear Clustering of PRC1 to Gene Silencing." *Developmental Cell* 26 (6): 565–77. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.016.

Kalb, Reinhard, Sebastian Latwiel, H Irem Baymaz, Pascal W T C Jansen, Christoph W Müller, Michiel Vermeulen, and Jürg Müller. 2014. "Histone H2A Monoubiquitination Promotes Histone H3 Methylation in Polycomb Repression." *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (6): 569–71. doi:10.1038/nsmb.2833.

Kalb, Reinhard, Donna L Mallery, Conor Larkin, Jeffrey T J Huang, and Kevin Hiom. 2014. "Report BRCA1 Is a Histone-H2A-Specific Ubiquitin Ligase" 1: 999–1005.

Kalenik JL, Chen D, Bradley ME et al 1997. "Yeast two-hybrid cloning of a novel zinc finger protein that interacts with the multifunctional transcription factor YY1." *Nucleic Acids Res* 25: 843–849

Kerscher, Oliver, Rachael Felberbaum, and Mark Hochstrasser. 2006. "Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22 (1): 159–80. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093503.

Kim, Hyungjin, and Alan D. D'Andrea. 2012. "Regulation of DNA Cross-Link Repair by the Fanconi anemia/BRCA Pathway." *Genes and Development* 26 (13): 1393–1408. doi:10.1101/gad.195248.112.

King, Ian F G, Richard B Emmons, Nicole J Francis, Brigitte Wild, Jürg Müller, Robert E Kingston, and Chao-Ting Wu. 2005. "Analysis of a Polycomb Group Protein Defines Regions That Link Repressive Activity on Nucleosomal Templates to in Vivo Function." *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6578–91. doi:10.1128/MCB.25.15.6578-6591.2005.

Klement, Karolin, Martijn S Luijsterburg, Jordan B Pinder, Chad S Cena, Victor Del Nero, Christopher M Wintersinger, Graham Dellaire, Haico van Attikum, and Aaron A Goodarzi. 2014. "Opposing ISWI- and CHD-Class Chromatin Remodeling Activities Orchestrate Heterochromatic DNA Repair." *The Journal of Cell Biology* 207 (6): 717–33. doi:10.1083/jcb.201405077.

Klose, Robert J., Sarah Cooper, Anca M. Farcas, Neil P. Blackledge, and Neil Brockdorff. 2013. "Chromatin Sampling-An Emerging Perspective on Targeting Polycomb Repressor Proteins." *PLoS Genetics* 9 (8). doi:10.1371/journal.pgen.1003717.

Kohlmaier, Alexander, Fabio Savarese, Monika Lachner, Joost Martens, Thomas Jenuwein, and Anton Wutz. 2004. "A Chromosomal Memory Triggered by Xist Regulates Histone Methylation in X Inactivation." *PLoS Biology* 2 (7). doi:10.1371/journal.pbio.0020171.

Kreis, N-N, F Louwen, and J Yuan. 2014. "Less Understood Issues: p21(Cip1) in Mitosis and Its Therapeutic Potential." *Oncogene* 0 (April): 1–10. doi:10.1038/onc.2014.133.

Krimpenfort, Paul, Annemieke Ijpenberg, Ji-Ying Song, Martin van der Valk, Martijn Nawijn, John Zevenhoven, and Anton Berns. 2007. "p15Ink4b Is a Critical Tumour Suppressor in the Absence of p16Ink4a." *Nature* 448 (7156): 943–46. doi:10.1038/nature06084.

Ku, Manching, Richard P. Koche, Esther Rheinbay, Eric M. Mendenhall, Mitsuhiro Endoh, Tarjei S. Mikkelsen, Aviva Presser, et al. 2008. "Genomewide Analysis of PRC1 and PRC2 Occupancy Identifies Two Classes of Bivalent Domains." *PLoS Genetics* 4 (10). doi:10.1371/journal.pgen.1000242.

Lüdtke, Timo H W, Henner F. Farin, Carsten Rudat, Karin Schuster-Gossler, Marianne Petry, Phil Barnett, Vincent M. Christoffels, and Andreas Kispert. 2013. “Tbx2 Controls Lung Growth by Direct Repression of the Cell Cycle Inhibitor Genes Cdkn1a and Cdkn1b.” *PLoS Genetics* 9 (1). doi:10.1371/journal.pgen.1003189.

Lahkim Bennani-Belhaj, Kenza, Sébastien Rouzeau, Géraldine Buhagiar-Labarchède, Pauline Chabosseau, Rosine Onclercq-Delic, Emilie Bayart, Fabrice Cordelières, Jérôme Couturier, and Mounira Amor-Guéret. 2010. “The Bloom Syndrome Protein Limits the Lethality Associated with RAD51 Deficiency.” *Molecular Cancer Research : MCR* 8 (3): 385–94. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0534.

Laulier, Corentin, Anita Cheng, and Jeremy M. Stark. 2011. “The Relative Efficiency of Homology-Directed Repair Has Distinct Effects on Proper Anaphase Chromosome Separation.” *Nucleic Acids Research* 39 (14): 5935–44. doi:10.1093/nar/gkr187.

Lee, Han-Sae, Shin-Ai Lee, Shin-Kyoung Hur, Jeong-Wook Seo, and Jongbum Kwon. 2014. “Stabilization and Targeting of INO80 to Replication Forks by BAP1 during Normal DNA Synthesis.” *Nature Communications* 5 (May): 5128. doi:10.1038/ncomms6128.

Lee, J., a. Kumagai, and W. G. Dunphy. 2007. “The Rad9-Hus1-Rad1 Checkpoint Clamp Regulates Interaction of TopBP1 with ATR.” *Journal of Biological Chemistry* 282 (38): 28036–44. doi:10.1074/jbc.M704635200.

Lee, Tong Ihn, Richard G. Jenner, Laurie A. Boyer, Matthew G. Guenther, Stuart S. Levine, Roshan M. Kumar, Brett Chevalier, et al. 2006. “Control of Developmental Regulators by Polycomb in Human Embryonic Stem Cells.” *Cell* 125 (2): 301–13. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.043.

Leeb, Martin, Diego Pasini, Maria Novatchkova, Markus Jaritz, Kristian Helin, and Anton Wutz. 2010. “Polycomb Complexes Act Redundantly to Repress Genomic Repeats and Genes.” *Genes and Development* 24 (3): 265–76. doi:10.1101/gad.544410.

Leeb, Martin, and Anton Wutz. 2007. “Ring1B Is Crucial for the Regulation of Developmental Control Genes and PRC1 Proteins but Not X Inactivation in Embryonic Cells.” *Journal of Cell Biology* 178 (2): 219–29. doi:10.1083/jcb.200612127.

Levine, Stuart S, Alona Weiss, Hediye Erdjument-Bromage, Zhaohui Shao, Paul Tempst, and Robert E Kingston. 2002. “The Core of the Polycomb Repressive Complex Is Compositionally and Functionally Conserved in Flies and Humans.” *Molecular and Cellular Biology* 22 (17): 6070–78. doi:10.1128/MCB.22.17.6070-6078.2002.



Levitt, Peter S, Min Zhu, Amy Cassano, Stephanie A Yazinski, Houchun Liu, Joshua Darfler, Rachel M Peters, and Robert S Weiss. 2007. "Genome Maintenance Defects in Cultured Cells and Mice Following Partial Inactivation of the Essential Cell Cycle Checkpoint Gene Hus1." *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2189–2201. doi:10.1128/MCB.01763-06.

Lewis, E. B. 1978. "A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*." *Nature* 276, 565-570.

Lin, Chia-yeh, Meng-ying Wu, Sophie Gay, Lisette Marjavaara, Mong Sing Lai, Wei-chun Hsiao, Shih-hsun Hung, et al. 2014. "H2B Mono-Ubiquitylation Facilitates Fork Stalling and Recovery during Replication Stress by Coordinating Rad53 Activation and Chromatin Assembly" 10 (10). doi:10.1371/journal.pgen.1004667.

Liu, Shengqin, Stephen O. Opiyo, Karoline Manthey, Jason G. Glanzer, Amanda K. Ashley, Courtney Amerin, Kyle Troksa, Meena Shrivastav, Jac A. Nickoloff, and Greg G. Oakley. 2012. "Distinct Roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA Phosphorylation and Checkpoint Activation in Response to Replication Stress." *Nucleic Acids Research* 40 (21): 10780–94. doi:10.1093/nar/gks849.

Lomonosov, Mikhail, Shubha Anand, Mahesh Sangrithi, Rachel Davies, and Ashok R. Venkitaraman. 2003. "Stabilization of Stalled DNA Replication Forks by the BRCA2 Breast Cancer Susceptibility Protein." *Genes and Development* 17 (24): 3017–22. doi:10.1101/gad.279003.

Lossaint, Gérald, Marion Larroque, Cyril Ribeyre, Nicole Bec, Christian Larroque, Chantal Décaillet, Kerstin Gari, and Angelos Constantinou. 2013. "FANCD2 Binds MCM Proteins and Controls Replisome Function upon Activation of S Phase Checkpoint Signaling." *Molecular Cell* 51: 678–90. doi:10.1016/j.molcel.2013.07.023.

Loyola, Alejandra, Hideaki Tagami, Tiziana Bonaldi, Danièle Roche, Jean Pierre Quivy, Axel Imhof, Yoshihiro Nakatani, Sharon Y R Dent, and Geneviève Almouzni. 2009. "The HP1 $\alpha$ -CAF1-SetDB1-Containing Complex Provides H3K9me1 for Suv39-Mediated K9me3 in Pericentric Heterochromatin." *EMBO Reports* 10 (7): 769–75. doi:10.1038/embor.2009.90.

Lukas, Jiri, Claudia Lukas, and Jiri Bartek. 2011. "More than Just a Focus: The Chromatin Response to DNA Damage and Its Role in Genome Integrity Maintenance." *Nature Cell Biology* 13 (10): 1161–69. doi:10.1038/ncb2344.

Maertens, Goedele N., Selma El Messaoudi-Aubert, Julie K. Racek, James Nicholls, Marc Rodriguez-Niedenführ, Jesus Gil, and Gordon Peters. 2009. "Several Distinct

Polycomb Complexes Regulate and Co-Localize on the INK4a Tumor Suppressor Locus.” *PLoS ONE* 4 (7). doi:10.1371/journal.pone.0006380.

Margueron, Raphael, Guohong Li, Kavitha Sarma, Alexandre Blais, Jiri Zavadil, Christopher L. Woodcock, Brian D. Dynlacht, and Danny Reinberg. 2008. “Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms.” *Molecular Cell* 32 (4): 503–18. doi:10.1016/j.molcel.2008.11.004.

McGinty, Robert K, Ryan C Henrici, and Song Tan. 2014. “Crystal Structure of the PRC1 Ubiquitylation Module Bound to the Nucleosome” 119. doi:10.1038/nature13890.

McIntosh, Debbie, and J. Julian Blow. 2012. “Dormant Origins, the Licensing Checkpoint, and the Response to Replicative Stresses.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (10). doi:10.1101/cshperspect.a012955.

Mikkelsen, Tarjei S, Manching Ku, David B Jaffe, Biju Issac, Erez Lieberman, Georgia Giannoukos, Pablo Alvarez, et al. 2007. “Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells.” *Nature* 448 (7153): 553–60. doi:10.1038/nature06008.

Mimeault M, Batra SK. 2006 Concise review: “Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies.” *Stem Cells* 24:2319–2345.

Mihaly, J., Mishra, R. K. and Karch, F. 1998. “A conserved sequence motif in Polycomb-response elements.” *Molecular Cell* 1, 1065-1066

Mohn F, Weber M, Rebhan M et al. 2008. “Lineage-specific Polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors.” *Molecular Cell* 30:755–766.

Moldovan, George-Lucian, and Alan D D’Andrea. 2009. “How the Fanconi Anemia Pathway Guards the Genome.” *Annual Review of Genetics* 43 (October): 223–49. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134222.

Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ 2004. “Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal”. *Current Opinion in Cell Biology* 16:700–707

Morita, S, T Kojima, and T Kitamura. 2000. “Plat-E: An Efficient and Stable System for Transient Packaging of Retroviruses.” *Gene Therapy* 7 (12): 1063–66. doi:10.1038/sj.gt.3301206.

Morrison SJ, Kimble J 2006. “Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.” *Nature* 441:1068–1074.

Müller J, Kassis JA 2006. “Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in *Drosophila*.” *Current Opinion in Genetics & Development* 16:476–484

Murphy, a. K., M. Fitzgerald, T. Ro, J. H. Kim, a. I. Rabinowitsch, D. Chowdhury, C. L. Schildkraut, and J. a. Borowiec. 2014. “Phosphorylated RPA Recruits PALB2 to Stalled DNA Replication Forks to Facilitate Fork Recovery.” *The Journal of Cell Biology* 206 (4): 493–507. doi:10.1083/jcb.201404111.

Naim, Valeria, and Filippo Rosselli. 2009. “The FANC Pathway and BLM Collaborate during Mitosis to Prevent Micro-Nucleation and Chromosome Abnormalities.” *Nature Cell Biology* 11 (6): 761–68. doi:10.1038/ncb1883.

Napoles, Mariana De, Jacqueline E Mermoud, Rika Wakao, Y Amy Tang, Mitusuhiro Endoh, Ruth Appanah, Tatyana B Nesterova, et al. 2004. “Polycomb Group Proteins Ring1A / B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation.” *Proteins* 7: 663–76.

Nguyen, Lan K., Javier Muñoz-García, Helene Maccario, Aaron Ciechanover, Walter Kolch, and Boris N. Kholodenko. 2011. “Switches, Excitable Responses and Oscillations in the ring1B/Bmi1 Ubiquitination System.” *PLoS Computational Biology* 7 (12): 1–11. doi:10.1371/journal.pcbi.1002317.

Nicassio, Francesco, Nadia Corrado, Joseph H A Vissers, Liliana B. Areces, Steven Bergink, Jurgen A. Marteijn, Bart Geverts, et al. 2007. “Human USP3 Is a Chromatin Modifier Required for S Phase Progression and Genome Stability.” *Current Biology* 17 (22): 1972–77. doi:10.1016/j.cub.2007.10.034.

Ogawa, Hidesato, Kei-ichiro Ishiguro, Stefan Gaubatz, and M Livingston. 2002. “A Complex with Chromatin Modifiers That Occupies E2F- and Myc-Responsive Genes in G 0 Cells.” *Science* 296 (May): 1132–36. doi:10.1126/science.1069861.

Ohashi, Eiji, Yukimasa Takeishi, Satoshi Ueda, and Toshiki Tsurimoto. 2014. “Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 Activates ATR-ATRIP and Promotes TopBP1 Recruitment to Sites of UV-Damage.” *DNA Repair* 21: 1–11. doi:10.1016/j.dnarep.2014.05.001.

Pan, Mei-Ren, Guang Peng, Wen-Chun Hung, and Shiaw-Yih Lin. 2011. “Monoubiquitination of H2AX Protein Regulates DNA Damage Response Signaling.” *Journal of Biological Chemistry* 286 (32): 28599–607. doi:10.1074/jbc.M111.256297.

Pasini, Diego, Adrian P Bracken, Jacob B Hansen, Manuela Capillo, and Kristian Helin. 2007. “The Polycomb Group Protein Suz12 Is Required for Embryonic Stem Cell

Differentiation.” *Molecular and Cellular Biology* 27 (10): 3769–79. doi:10.1128/MCB.01432-06.

Petermann, Eva, Manuel Luís Orta, Natalia Issaeva, Niklas Schultz, and Thomas Helleday. 2010. “Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair.” *Molecular Cell* 37 (4): 492–502. doi:10.1016/j.molcel.2010.01.021.

Petruk, Svetlana, Yurii Sedkov, Danika M. Johnston, Jacob W. Hodgson, Kathryn L. Black, Sina K. Kovermann, Samantha Beck, Eli Canaani, Hugh W. Brock, and Alexander Mazo. 2012. “TrxG and PcG Proteins but Not Methylated Histones Remain Associated with DNA through Replication.” *Cell* 150: 922–33. doi:10.1016/j.cell.2012.06.046.

Pinheiro, Inês, Raphaël Margueron, Nicholas Shukeir, Michael Eisold, Christoph Frittsch, Florian M. Richter, Gerhard Mittler, et al. 2012. “Prdm3 and Prdm16 Are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity.” *Cell* 150 (5): 948–60. doi:10.1016/j.cell.2012.06.048.

Piunti, Andrea, Alessandra Rossi, Aurora Cerutti, Mareike Albert, Sriganesh Jammula, Andrea Scelfo, Laura Cedrone, et al. 2014. “Polycomb Proteins Control Proliferation and Transformation Independently of Cell Cycle Checkpoints by Regulating DNA Replication.” *Nature Communications* 5: 3649. doi:10.1038/ncomms4649.

Posfai, Eszter, Rico Kunzmann, Vincent Brochard, Juliette Salvaing, Erik Cabuy, Tim C. Roloff, Zichuan Liu, et al. 2012. “Polycomb Function during Oogenesis Is Required for Mouse Embryonic Development.” *Genes and Development* 26 (9): 920–32. doi:10.1101/aad.188094.112.

Price, Brendan D., and Alan D. D’Andrea. 2013. “Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks.” *Cell* 152 (6): 1344–54. doi:10.1016/j.cell.2013.02.011.

Qiao F, Bowie JU 2005. “The many faces of SAM.” *Science Signaling* Vol. 2005, Issue 286, pp. re7

Quivy, Jean-Pierre, Annabelle Gérard, Adam J L Cook, Danièle Roche, and Geneviève Almouzni. 2008. “The HP1-p150/CAF-1 Interaction Is Required for Pericentric Heterochromatin Replication and S-Phase Progression in Mouse Cells.” *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (9): 972–79. doi:10.1038/nsmb.1470.

Raderschall, Elke, Alex Bazarov, Jiangping Cao, Rudi Lurz, Avril Smith, Wolfgang Mann, Hans-Hilger Ropers, et al. 2002. “Formation of Higher-Order Nuclear Rad51 Structures Is Functionally Linked to p21 Expression and Protection from DNA Damage-

Induced Apoptosis.” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 1): 153–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801733>.

Raderschall, Elke, Karen Stout, Susanne Freier, Vanessa Suckow, Susann Schweiger, and Thomas Haaf. 2002. “Elevated Levels of Rad51 Recombination Protein in Tumor Cells.” *Cancer Research* 62 (1): 219–25.

Raghunandan, Maya, Indrajit Chaudhury, Stephanie L. Kelich, Helmut Hanenberg, and Alexandra Sobek. 2015. “FANCD2, FANCI and BRCA2 Cooperate to Promote Replication Fork Recovery Independently of the Fanconi Anemia Core Complex.” *Cell Cycle* 14 (3): 342–53. doi:10.4161/15384101.2014.987614.

Ringrose, Leonie, and Renato Paro. 2004. “Epigenetic Regulation of Cellular Memory by the Polycomb and Trithorax Group Proteins.” *Annual Review of Genetics* 38: 413–43. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091907.

Rinn, John L., Michael Kertesz, Jordon K. Wang, Sharon L. Squazzo, Xiao Xu, Samantha A. Bruggmann, L. Henry Goodnough, et al. 2007. “Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs.” *Cell* 129 (7): 1311–23. doi:10.1016/j.cell.2007.05.022.

Rodrigue, A, Y Coulombe, K Jacquet, J P Gagne, C Roques, S Gobeil, G Poirier, and J Y Masson. 2013. “The RAD51 Paralogs Ensure Cellular Protection against Mitotic Defects and Aneuploidy.” *J Cell Sci* 126 (Pt 1): 348–59. doi:10.1242/jcs.114595.

Román-Trufero, Mónica, Héctor R. Méndez-Gómez, Claudia Pérez, Atsushi Hijikata, Yu Ichi Fujimura, Takaho Endo, Haruhiko Koseki, Carlos Vicario-Abejón, and Miguel Vidal. 2009. “Maintenance of Undifferentiated State and Self-Renewal of Embryonic Neural Stem Cells by Polycomb Protein Ring1B.” *Stem Cells* 27 (7): 1559–70. doi:10.1002/stem.82.

Salic, Adrian, and Timothy J Mitchison. 2008. “A Chemical Method for Fast and Sensitive Detection of DNA Synthesis in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7): 2415–20. doi:10.1073/pnas.0712168105.

Sanchez, C., I. Sanchez, J. a. a. Demmers, P. Rodriguez, J. Strouboulis, and M. Vidal. 2007. “Proteomics Analysis of Ring1B/Rnf2 Interactors Identifies a Novel Complex with the Fbxl10/JhdmlB Histone Demethylase and the Bcl6 Interacting Corepressor.” *Molecular & Cellular Proteomics* 6 (5): 820–34. doi:10.1074/mcp.M600275-MCP200.

Sánchez-Beato, Margarita, Esther Sánchez, Juan F. García, Alberto Pérez-Rosado, María C. Montoya, Mario Fraga, M. J. Artiga, et al. 2004. “Abnormal PcG Protein

Expression in Hodgkin's Lymphoma. Relation with E2F6 and NFκB Transcription Factors." *Journal of Pathology* 204 (5): 528–37. doi:10.1002/path.1661.

Sánchez-Beato, Margarita, Esther Sánchez, Joaquín González-Carreró, Manuel Morente, Ana Díez, Lydia Sánchez-Verde, María Carmen Martín, Juan C Cigudosa, Miguel Vidal, and Miguel a Piris. 2006. "Variability in the Expression of Polycomb Proteins in Different Normal and Tumoral Tissues. A Pilot Study Using Tissue Microarrays." *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 19 (5): 684–94. doi:10.1038/modpathol.3800577.

Sanchez-Pulido, Luis, Damien Devos, Zinmay Sung, and Myriam Calonje. 2008. "RAWUL: A New Ubiquitin-like Domain in PRC1 Ring Finger Proteins That Unveils Putative Plant and Worm PRC1 Orthologs." *BMC Genomics* 9 (1): 308. doi:10.1186/1471-2164-9-308.

Satijn David P, Marco J Gunster, Johan van der Vlag, Karien M Hamer, Saurin, A J, P S Freemont, R van Driel, and Arie P Otte. 1997. "RING1 Is Associated with the Polycomb Group Protein Complex and Acts as a Transcriptional Repressor" 17 (7): 4105–13.

Saurin, Andrew J., Katherine L B Borden, Michael N. Boddy, and Paul S. Freemont. 1996. "Does This Have a Familiar RING?" *Trends in Biochemical Sciences* 21 (6): 208–14. doi:10.1016/0968-0004(96)10036-0.

Savage, John R K. 1988. "A Comment on the Quantitative Relationship between Micronuclei and Chromosomal Aberrations." *Mutation Research Letters* 207 (1): 33–36. doi:10.1016/0165-7992(88)90008-5.

Schlacher, Katharina, Nicole Christ, Nicolas Siaud, Akinori Egashira, Hong Wu, and Maria Jasin. 2011. "Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11." *Cell* 145 (4): 529–42. doi:10.1016/j.cell.2011.03.041.

Schlacher, Katharina, Hong Wu, and Maria Jasin. 2012. "A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2." *Cancer Cell* 22 (1): 106–16. doi:10.1016/j.ccr.2012.05.015.

Schmitges, Frank W., Archana B. Prusty, Mahamadou Faty, Alexandra Stützer, Gondichatnahalli M. Lingaraju, Jonathan Aiwazian, Ragna Sack, et al. 2011. "Histone Methylation by PRC2 Is Inhibited by Active Chromatin Marks." *Molecular Cell* 42 (3): 330–41. doi:10.1016/j.molcel.2011.03.025.

Schoeftner, Stefan, Aditya K Sengupta, Stefan Kubicek, Karl Mechtler, Laura Spahn, Haruhiko Koseki, Thomas Jenuwein, and Anton Wutz. 2006. "Recruitment of PRC1 Function at the Initiation of X Inactivation Independent of PRC2 and Silencing." *The EMBO Journal* 25 (13): 3110–22. doi:10.1038/sj.emboj.7601187.

Schoorlemmer, Jon, Camelia Marcos-Gutiérrez, Felipe Were, Rodrigo Martinez, Emiliano Garcia, David P E Satijn, Arie P. Otte, and Miguel Vidal. 1997. "Ring1A Is a Transcriptional Repressor That Interacts with the Polycomb-M33 Protein and Is Expressed at Rhombomere Boundaries in the Mouse Hindbrain." *EMBO Journal* 16 (19): 5930–42. doi:10.1093/emboj/16.19.5930.

Schwartz, Yuri B., and Vincenzo Pirrotta. 2013. "A New World of Polycombs: Unexpected Partnerships and Emerging Functions." *Nature Reviews Genetics* 14 (12): 853–64. doi:10.1038/nrg3603.

Segurado, Monica, and JFX Diffley. 2008. "Separate Roles for the DNA Damage Checkpoint Protein Kinases in Stabilizing DNA Replication Forks." *Genes & Development*, 1816–27. doi:10.1101/gad.477208.tion.

Sharif, Jafar, Masahiro Muto, Shin-ichiro Takebayashi, Isao Suetake, Akihiro Iwamatsu, Takaho a Endo, Jun Shinga, et al. 2007. "The SRA Protein Np95 Mediates Epigenetic Inheritance by Recruiting Dnmt1 to Methylated DNA." *Nature* 450 (7171): 908–12. doi:10.1038/nature06397.

Shen, Xiaohua, Yingchun Liu, Yu-Jung Hsu, Yuko Fujiwara, Jonghwan Kim, Xiaohong Mao, Guo-Cheng Yuan, and Stuart H. Orkin. 2008. "EZH1 Mediates Methylation on Histone H3 Lysine 27 and Complements EZH2 in Maintaining Stem Cell Identity and Executing Pluripotency." *Molecular Cell* 32 (4): 491–502. doi:10.1016/j.molcel.2008.10.016.

Smith, Joanne, Lye Mun Tho, and Naihan Xu. 2010. "The ATM – Chk2 and ATR – Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer." *Advances in Cancer Research*, n°. 10: 73–112. doi:10.1016/S0065-230X(10)08002-4.

Somyajit, Kumar, Sneha Saxena, Sharath Babu, Anup Mishra, and Ganesh Nagaraju. 2015. "Mammalian RAD51 Paralogs Protect Nascent DNA at Stalled Forks and Mediate Replication Restart." *Nucleic Acids Research*, gkv880. doi:10.1093/nar/gkv880.

Stock, Julie K, Sara Giadrossi, Miguel Casanova, Emily Brookes, Miguel Vidal, Haruhiko Koseki, Neil Brockdorff, Amanda G Fisher, and Ana Pombo. 2007. "Ring1-Mediated Ubiquitination of H2A Restrains Poised RNA Polymerase II at Bivalent Genes in Mouse ES Cells." *Nature Cell Biology* 9 (12): 1428–35. doi:10.1038/ncb1663.

Stoleru, Dan, Ying Peng, José Agosto, and Michael Rosbash. 2004. "Coupled Oscillators Control Morning and Evening Locomotor Behaviour of *Drosophila*." *Nature* 431 (7010): 862–68. doi:10.1038/nature02926.

Tavares, Lúcia, Emilia Dimitrova, David Oxley, Judith Webster, Raymond Poot, Jeroen Demmers, Karel Bezstarosti, et al. 2012. "RYBP-PRC1 Complexes Mediate H2A Ubiquitylation at Polycomb Target Sites Independently of PRC2 and H3K27me3." *Cell* 148 (4): 664–78. doi:10.1016/j.cell.2011.12.029.

Técher, Hervé, Stéphane Koundrioukoff, Dana Azar, Therese Wilhelm, Sandra Carignon, Olivier Brison, Michelle Debatisse, and Benoît Le Tallec. 2013. "Replication Dynamics: Biases and Robustness of DNA Fiber Analysis." *Journal of Molecular Biology* 425: 4845–55. doi:10.1016/j.jmb.2013.03.040.

Thomas, Philip, and Michael Fenech. 2011. "Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay in Lymphocytes." *Methods in Molecular Biology* 682: 217–34. doi:10.1007/978-1-60327-409-8\_16.

Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. and Mazo, A. 1999. Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Molecular Cell Biology* 19: 5189-5202.

Trujillo, Kelly M., and Mary Ann Osley. 2012. "A Role for H2B Ubiquitylation in DNA Replication." *Molecular Cell* 48 (5): 734–46. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.019.

Valklingbeek, M. 2004. "Stem Cells and CancerThe Polycomb Connection." *Cell* 118 (4): 409–18.

van Leenders, Geert J L H, Danny Dukers, Daphne Hessels, Susan W M van den Kieboom, Christina A. Hulsbergen, J. Alfred Witjes, Arie P. Otte, Chris J. Meijer, and Frank M. Raaphorst. 2007. "Polycomb-Group Oncogenes EZH2, BMI1, and RING1 Are Overexpressed in Prostate Cancer With Adverse Pathologic and Clinical Features." *European Urology* 52 (2): 455–63. doi:10.1016/j.eururo.2006.11.020.

Vassin, Vitaly M, Rachel William Anantha, Elena Sokolova, Shlomo Kanner, and James a Borowiec. 2009. "Human RPA Phosphorylation by ATR Stimulates DNA Synthesis and Prevents ssDNA Accumulation during DNA-Replication Stress." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 22): 4070–80. doi:10.1242/jcs.053702.



Vissers, J. H. A., M. van Lohuizen, and E. Citterio. 2012. "The Emerging Role of Polycomb Repressors in the Response to DNA Damage." *Journal of Cell Science* 125 (17): 3939–48. doi:10.1242/jcs.107375.

Voncken, Jan Willem, Bernard a J Roelen, Mieke Roefs, Stijn de Vries, Els Verhoeven, Silvia Marino, Jacqueline Deschamps, and Maarten van Lohuizen. 2003. "Rnf2 (Ring1b) Deficiency Causes Gastrulation Arrest and Cell Cycle Inhibition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2468–73. doi:10.1073/pnas.0434312100.

Walter, J, and J Newport. 2000. "Initiation of Eukaryotic DNA Replication: Origin Unwinding and Sequential Chromatin Association of Cdc45, RPA, and DNA Polymerase Alpha." *Molecular Cell* 5 (4): 617–27. doi:S1097-2765(00)80241-5.

Wang, Bin, Shuhei Matsuoka, Phillip B Carpenter, and Stephen J Elledge. 2002. "53BP1, a Mediator of the DNA Damage Checkpoint." *Science (New York, N.Y.)* 298 (5597): 1435–38. doi:10.1126/science.1076182.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S. and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Wang, Qian, Timothy R Chan, Robert Hilgraf, Valery V Fokin, K Barry Sharpless, and M G Finn. 2003. "Bioconjugation by Copper ( I ) -Catalyzed Azide-Alkyne [ 3 + 2 ] Cycloaddition." *Journal of American Chemical Society* n°. I: 3192–93.

Wang, Weidong. 2007. "Emergence of a DNA-Damage Response Network Consisting of Fanconi Anaemia and BRCA Proteins." *Nature Reviews. Genetics* 8 (10): 735–48. doi:10.1038/nrg2159.

Wani, Ajazul H., Alistair N. Boettiger, Patrick Shoderet, Ayla Ergun, Christine Munger, Ruslan I. Sadreyev, Xiaowei Zhuang, Robert E Kingston, and Nicole Francis. 2015. "Chromatin Topology Is Coupled to Polycomb Group Protein Subnuclear Organization." (*in Review at Science*) 7. doi:10.1038/ncomms10291.

Ward, Irene M., and Junjie Chen. 2001. "Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-Dependent Manner in Response to Replicational Stress." *Journal of Biological Chemistry* 276 (51): 47759–62. doi:10.1074/jbc.C100569200.

Weissman, I L. 2000. "Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution." *Cell* 100 (1): 157–68. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X.

Wilhelm, Therese, Indiana Magdalou, Aurélia Barascu, Hervé Técher, Michelle Debatisse, and Bernard S Lopez. 2014. "Spontaneous Slow Replication Fork Progression Elicits Mitosis Alterations in Homologous Recombination-Deficient Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2): 763–68. doi:10.1073/pnas.1311520111.

Woodward, Anna M., Thomas Göhler, M. Gloria Luciani, Maren Oehlmann, Xinquan Ge, Anton Gartner, Dean A. Jackson, and J. Julian Blow. 2006. "Excess Mcm2-7 License Dormant Origins of Replication That Can Be Used under Conditions of Replicative Stress." *Journal of Cell Biology* 173 (5): 673–83. doi:10.1083/jcb.200602108.

Wu, Rong, Prim B. Singh, and David M. Gilbert. 2006. "Uncoupling Global and Fine-Tuning Replication Timing Determinants for Mouse Pericentric Heterochromatin." *Journal of Cell Biology* 174 (2): 185–94. doi:10.1083/jcb.200601113.

Wu, Xudong, Jens Vilstrup Johansen, and Kristian Helin. 2013. "Fbxl10/Kdm2b Recruits Polycomb Repressive Complex 1 to CpG Islands and Regulates H2A Ubiquitylation." *Molecular Cell* 49 (6): 1134–46. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.016.

Yeo, J. E., E. H. Lee, E. a. Hendrickson, and a. Sobeck. 2014. "CtIP Mediates Replication Fork Recovery in a FANCD2-Regulated Manner." *Human Molecular Genetics* 23 (14): 3695–3705. doi:10.1093/hmg/ddu078.

Zaaroor-Regev, D., P. de Bie, M. Scheffner, T. Noy, R. Shemer, M. Heled, I. Stein, E. Pikarsky, and A. Ciechanover. 2010. "Regulation of the Polycomb Protein Ring1B by Self-Ubiquitination or by E6-AP May Have Implications to the Pathogenesis of Angelman Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (15): 6788–93. doi:10.1073/pnas.1003108107.

Zheng, Li, Huifang Dai, Mian Zhou, Xiaojin Li, Changwei Liu, Zhigang Guo, Xiwei Wu, et al. 2012. "Polyploid Cells Rewire DNA Damage Response Networks to Overcome Replication Stress-Induced Barriers for Tumour Progression." *Nature Communications* 3 (May): 815. doi:10.1038/ncomms1825.

Zhu, Ping, Wenlai Zhou, Jianxun Wang, Janusz Puc, Kenneth A. Ohgi, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, Christopher K. Glass, and Michael G. Rosenfeld. 2007. "A Histone H2A Deubiquitinase Complex Coordinating Histone Acetylation and H1 Dissociation in Transcriptional Regulation." *Molecular Cell* 27 (4): 609–21. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.024.

Zhu, Quan, Gerald M. Pao, Alexis M. Huynh, Hoonkyo Suh, Nina Tonnu, Petra M. Nederlof, Fred H. Gage, and Inder M. Verma. 2011. "BRCA1 Tumour Suppression Occurs

via Heterochromatin-Mediated Silencing.” *Nature* 477 (7363): 179–84. doi:10.1038/nature10371.

Ziv, Yael, Dana Bielopolski, Yaron Galanty, Claudia Lukas, Yoichi Taya, David C. Schultz, Jiri Lukas, Simon Bekker-Jensen, Jiri Bartek, and Yosef Shiloh. 2006. “Chromatin Relaxation in Response to DNA Double-Strand Breaks Is Modulated by a Novel ATM- and KAP-1 Dependent Pathway.” *Nature Cell Biology* 8 (8): 870–76. doi:10.1038/ncb1446.

Zou, Lee, and Stephen J Elledge. 2003. “Sensing DNA Damage through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes.” *Science (New York, N.Y.)* 300 (5625): 1542–48. doi:10.1126/science.1083430.

## **PUBLICACIONES**

---